

LUIZ FELIPE MOSCALESKI CAVAZZANI

Diagnóstico imunológico, histopatológico e molecular das subespécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de bovinos da região centro oriental do Paraná, Brasil

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2009

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Cavazzani, Luiz Felipe Moscaleski

Diagnóstico imunológico, histopatológico e molecular das subespécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de bovinos da região centro oriental do Paraná, Brasil. / Luiz Felipe Moscaleski Cavazzani. – Curitiba, 2009.
82f.: il. ; 30cm.

Orientador: Alexander Welker Biondo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Tuberculose em bovinos I. Título II. Biondo, Alexander Welker III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dr. Alexander Welker Biondo

Orientador e presidente da Banca (Universidade Federal do Paraná - UFPR)


Dr. Ivan de Barros Roque Filho

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)


Dr. Stênio Perdigão Fragoso

(Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP)

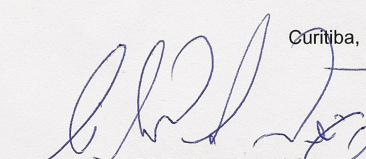
Como Suplente:

Dr. Silvio Marques Zanata

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Após argüir o(a) mestrando(a) **Luiz Felipe Moscaleski Cavazzani** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "**Diagnóstico histopatológico e molecular das subespécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de Bovinos**", é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.


Curitiba, 28 de setembro de 2009.

Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso





Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

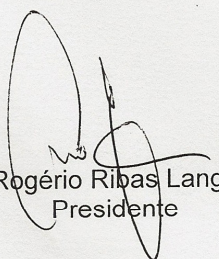
CERTIFICADO

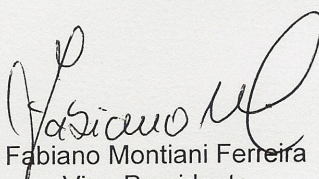
Certificamos que o protocolo no. 008/2008, referente ao projeto “Diagnóstico e epidemiologia molecular das subespécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de bovinos”, sob a responsabilidade de Luiz Felipe Moscaleski Cavazzani, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 07 de maio de 2008. Este certificado expira em 31 de agosto de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 008/2008, regarding the project “Diagnosis and molecular epidemiology of the subspecies of *Mycobacterium tuberculosis* complex in samples cattle”, in charge of Luiz Felipe Moscaleski Cavazzani in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on may 07, 2008. This certificate expires on august, 2009.

Curitiba, 11 de agosto de 2008


Rogério Ribas Lange
Presidente


Fabiano Montiani Ferreira
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná

A Nossa Senhora da Ternura,
sempre demonstrando sua fortaleza.

A todos que estiveram ao meu lado,
estão e sempre estarão.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo.

A Deus, por nunca me abandonar e ser o progenitor de tudo o que somos e o que estudamos.

A toda minha família, em especial meu Pai, José Roberto Cavazzani e minha Mãe, Maria Alice M. Cavazzani. Sem palavras para agradecer o companheirismo e o apoio em todos os momentos. Ao meu irmão por toda a sua preocupação e apoio. A minha esposa, Danielle, pelo seu imenso amor e dedicação em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, orientador deste projeto, meu mais sincero agradecimento. Agradeço por todas as oportunidades concedidas.

A Equipe do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, em especial a Maria Ângela Teixeira, Sônia Biesdorf e Regina de Carvalho, pela confiança e inestimável colaboração em todos os experimentos desde o princípio deste estudo. A direção do CDME na pessoa de Mara Elisa Gasino Joineau pela disponibilidade da execução prática de parte desta dissertação.

Meus agradecimentos à direção do Laboratório Central do Estado do Paraná, em especial a Dr^a. Célia Fagundes da Cruz e ao Dr. Marcelo Pilonetto, que viabilizaram a execução prática deste trabalho.

Minha gratidão a Irina Nastassja Riediger e Sueli Massumi Nakatani, da Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, pelo apoio, conhecimento e pelas discussões técnico-científicas e pela generosidade em partilhar suas experiências.

As amigas Sandra Curotto, Marina Gonçalves e Fernanda Monego por todo o companheirismo e ajuda em todos os momentos.

A todos os colegas que participaram da coleta das amostras, em especial ao Prof. Dr. Ivan Barros e ao Prof. Carlos Roberto Conti Naumann e sua equipe. Agradeço também a todos os Magarefes do abatedouro frigorífico Argus Ltda. pelos seus conhecimentos e presteza para a coleta do material.

Aos Médicos Veterinários Günther Schartner e André, pela presteza e providenciarem os Bovinos para a realização desta dissertação.

Ao Prof. Renato Souza e toda sua equipe do Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR por todo o seu conhecimento e disponibilidade para auxiliar nesta dissertação.

Ao Dr. Stênio Perdigão, do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), pela inestimável ajuda e companheirismo.

A Fundação Araucária, pelo suporte financeiro e a CAPES pelo auxílio de bolsa concedido nos primeiros meses da realização desta dissertação.

A Prefeitura Municipal de Curitiba, por todo o apoio e interesse para que eu realizasse este trabalho.

A todo o Rebanho Bovino, que nos proporciona alimentação e conhecimento.

“Foi o tempo que investiste em tua rosa que fez tua rosa tão
importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 GERAL	3
2.2 ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Tuberculose Bovina	5
3.2 Contaminações Interespecíficas	6
3.3 Métodos Diagnósticos	6
3.3.1 Diagnóstico Clínico	7
3.3.2 Tuberculinização	8
3.3.3 Diagnóstico Bacteriológico	9
3.3.4 Diagnóstico <i>post mortem</i>	10
3.3.5 Diagnóstico Histopatológico	11
3.3.6 Diagnóstico Molecular	11
3.3.7 Novas Metodologias de Diagnóstico	12
4. METODOLOGIAS	15
4.1 Animais e Amostras	15
4.2 Preparo das Amostras	15
4.3 Histopatologia	16
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
4.5 Sequenciamento	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Tuberculinização	19
5.2 Análise Macroscópica <i>post mortem</i>	19
5.3 Análise Histopatológica	20
5.4 Cultivo Bacteriológico	21
5.5 Análise Molecular	22
6. CONCLUSÕES	25
7. REFERÊNCIAS	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1	- Interpretação do teste cervical simples em bovinos	9
FIGURA 1	- Amostra de pulmão/linfonodo mediastínico com lesão sugestiva de tuberculose.	20
FIGURA 2	- Amplificação do gene <i>rpoβ</i> onde os números 1, 2, 5 e 35 correspondem as amostras de mesmo número, o símbolo – representa o controle negativo, o símbolo + representa o controle positivo (<i>M. bovis</i> cepa ATCC 19210) e BM corresponde ao marcador de massa molecular.	23
QUADRO 1	- Análise através do programa BLAST mostrando uma máxima identidade com várias espécies de micobactérias	23

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- por cento
ATCC	- American Type Culture Collection
BAAR	- Bacilos álcool ácido resistentes
BLAST	- Abreviatura para Basic Local Alignment Search Tool
°C	- Graus Celsius
CDME	- Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleosídeo Trifosfatado
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	- Abreviatura da expressão latina <i>et alii</i> , para demais colaboradores
IFN-γ	- Interferon γ
Kb	- Kilobase
KCl	- Cloreto de Potássio
LACEN-PR	- Laboratório Central do Estado do Paraná
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
NaCl	- Cloreto de Sódio
ng	- Nanograma (10 ⁻⁹ g)
nm	- Nanômetro
Pb	- Pares de Bases
PBS	- Salina tamponada com fosfatos
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pmol	- Picomol
rpm	- Rotações por minuto
rpoβ	- Subunidade β da RNA polimerase bacteriana
RNA	- Ácido Ribonucléico
SESA-PR	- Secretaria de Estado da Saúde, Paraná
TB	- Tuberculose
TBE	- Tampão Tris-Borato-EDTA
TNFα	- Fator de Necrose Tumoral α
Tris	- Hidroximetilaminometano
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Radiação Ultravioleta
V	- Volt
μg	- Micrograma (10 ⁻⁶ g)
μM	- Micromolar

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de abrangência mundial que afeta seres humanos e diversas espécies de animais. A principal espécie de microorganismo infectante dos bovinos é *Mycobacterium bovis*, que pelo número de casos, é uma manifestação endêmica no Brasil e causa prejuízos econômicos porque interfere na redução da produtividade do rebanho e perdas de carcaças no frigorífico. Ainda, por se tratar de uma zoonose, *M. bovis* pode infectar seres humanos, causando uma doença clinicamente e patologicamente indistinguível da infecção por *M. tuberculosis*. Apesar da falta de informações e da importância da tuberculose bovina para a saúde da população, o aumento do número de pacientes imunossuprimidos no país, principalmente pelo vírus da imunodeficiência humana, causa preocupação em relação às doenças causadas por espécies atípicas.

Um total de 35 bovinos reagentes, ou indeterminados e negativos à prova de tuberculinização foram utilizados, tendo amostras de tecidos colhidas no momento do abate. Em relação à prova de Tuberculina 48,57% (17/35) dos animais foram diagnosticados positivos para Tuberculose, 22,86% (8/35) apresentaram resultado inconclusivo e 28,57% (10/35) apresentaram resultado negativo. Do total de bovinos examinados, 85,71% (30/35) apresentaram lesão macroscópica sugestiva de tuberculose. Na avaliação microscópica (Citologia) 60,00% (21/35) apresentaram características de algum tipo de lesão. Na avaliação histopatológica, 40,00% (14/35) dos animais apresentaram lesões granulomatosas características de tuberculose, onde foram visualizados Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). Com a interposição destes dados obtemos que dos 17 animais positivos para prova da tuberculina 58,82% (10/17) animais não apresentaram lesão característica de tuberculose com a presença de BAAR, 88,23% (15/17) tinham lesão macroscópica sugestiva de tuberculose e 52,94% (9/17) apresentavam algum tipo de lesão microscópica.

Para a análise molecular foi utilizada a metodologia de análise do gene, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (*rpo β*). Foram selecionadas as amostras dos linfonodos carotídeos para desenvolver esta metodologia. O seu DNA foi extraído em dois momentos. O primeiro momento foi sem o isolamento da cultura, sendo extraído DNA do tecido intacto através da técnica de Fenol-

Clorofórmio. Nesta análise não foi possível a amplificação do DNA, fato este esperado pela dificuldade de se obter quantidade de DNA suficiente para amplificação na metodologia de PCR. O segundo momento foi feita a extração de DNA das amostras que obtiveram crescimento no meio de cultura *Lowenstein-Jensen* (amostra 35) e *Stonebrink* (amostras 1, 2 e 5). O produto desta PCR foi purificado e encaminhado para o seqüenciamento, usando as metodologias descritas no ponto 4 desta dissertação.

O seqüenciamento da amostra 1 mostrou um fragmento com 746 nucleotídeos, a amostra dois 728 nucleotídeos, a amostra 5 743 nucleotídeos e a amostra 35 apresentou um fragmento de 742 nucleotídeos. Quando realizamos as análises pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) obtemos para todas as amostras o mesmo resultado. Isto demonstra que a utilização do gene *rpoB* para a caracterização de subtipos de *M. bovis* nesta região não é recomendada.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease of world-wide that affects humans and several species of animals. The main species of microorganism infecting animals is of *Mycobacterium bovis*, that the number of cases, is a manifestation endemic in Brazil and causes economic losses because it interferes with reduced productivity and loss of livestock carcasses in the refrigerator. Still, because it is a zoonosis, *M. bovis* can infect humans, causing a disease clinically and pathologically indistinguishable from infection by *M. tuberculosis*. Despite the lack of information and the importance of bovine tuberculosis to the health of the population, the increasing number of immunocompromised patients in the country, especially the human immunodeficiency virus, causes concern about the diseases caused by atypical species.

A total of 35 cattle reagents, negative or indeterminate and the tuberculin test were used, and tissue samples taken at slaughter. The animals examined, 85.71% (30/35) showed gross lesions suggestive of tuberculosis. On microscopic evaluation (cytology) 60.00% (21/35) showed characteristics of

some type of injury. In histopathological evaluation, 40.00% (14/35) of the animals showed granulomatous lesions characteristic of tuberculosis, which were visualized acid resistant bacilli (AFB). In relation to the test 48.57% (17/35) of animals were diagnosed positive for TB, 22.86% (8 / 35) had inconclusive results and 28,57% (10/35) tested negative. With the filing of these data we obtain from the 17 animals positive for the tuberculin 58.82% (10/17) animals showed lesions characteristic of tuberculosis in the presence of AFB, 88.23% (15/17) had macroscopic lesions suggestive tuberculosis and 52.94% (9 / 17) had some type of microscopic damage.

For molecular analysis we used the methodology of analysis of the gene, which encodes the β subunit of RNA polymerase (*rpo* β). We selected the samples of lymph carotid to develop this methodology. His DNA was extracted in two stages. The first time was without the isolation of the culture, and extracted DNA from intact tissue using the technique of phenol-chloroform. This analysis was not possible to amplify the DNA, a fact expected by the difficulty in obtaining sufficient quantities of DNA for amplification in PCR methodology. The second time was made to extract DNA from samples obtained through growth in Lowenstein-Jensen culture (sample 35) and Stonebrink (samples 1, 2 and 5).

The product of this PCR was purified and sent for sequencing using the methods described in chapter 4 of this dissertation. The sequencing of sample 1 showed a fragment with 746 nucleotides, the sample two 728 nucleotides, the sample 5 743 nucleotides and sample 35 showed a fragment of 742 nucleotides. When we perform the analysis by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) to get all the samples the same result. This demonstrates that the use of gene *rpo* β characterize subtypes of *M. bovis* in this region is not recommended.

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido no Setor de Biologia Molecular do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR) e no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME), sob convênio estabelecido entre estas duas instituições do Governo Estadual e a Universidade Federal do Paraná. Este projeto teve como premissa a seleção, otimização e validação de um método molecular para o diagnóstico de espécies de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* que estariam contaminando rebanhos bovinos do Estado do Paraná. Para o desenvolvimento deste projeto o mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias desta Universidade sob protocolo 008/2008 e financiado por verba do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Ciência e Tecnologia para o SUS sob protocolo 9040 da Fundação Araucária.

Durante o período do estudo, foram avaliados casos de animais com resultados positivos e indeterminados para o teste de tuberculina, encaminhados para abate sanitário no Frigorífico Argus Ltda. de São José dos Pinhais, Paraná. A coleta foi autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento na pessoa do Prof. Carlos Roberto Conti Naumann, professor da disciplina de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Departamento de Medicina Veterinária-UFPR. Foram coletadas amostras destes animais para se obter material necessário para os procedimentos de Histopatologia, Cultivo celular e Biologia Molecular empregados neste caso.

Pretende-se, com a análise, discussão e publicação dos resultados deste trabalho, traçar aspectos de vigilância epidemiológica dos rebanhos bovinos de produção de carne e leite. Isto é necessário para um melhor entendimento da contaminação de tuberculose bovina, possibilitando assim maneiras mais eficazes de controle, monitoramento e erradicação da doença, evitando perda na produção dos rebanhos e possíveis contágios inter-específicos (contaminação da tuberculose entre espécies diferentes).

O artigo de revisão de literatura em anexo foi submetido para a Revista de Veterinária e Zootecnia, da UNESP – Botucatu/SP (ISSN 0102-5716). O

segundo artigo consistiu da apresentação dos resultados obtidos nos ensaios de histopatologia realizados, submetida para Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (ISSN 0100-736X). No terceiro artigo os ensaios de Biologia Molecular que foram realizados são discutidos e apresentados em formato de publicação para a Revista Zoonoses Public Health (ISSN 1863-2378).

Esta iniciativa visa acelerar a divulgação científica dos dados encontrados e permitir que o Comitê de Avaliação contribua com críticas e sugestões tanto na forma quanto ao conteúdo dos trabalhos propostos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o uso de técnicas moleculares e histopatológicas na caracterização e diagnóstico da tuberculose bovina na região centro oriental do Estado do Paraná.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1- Comparar as amostras teciduais mais adequadas para diagnóstico *post mortem*, através de análises histopatológicas, utilizando animais previamente positivos na tuberculinização.
- 2- Estabelecer o diagnóstico molecular da tuberculose como rotina no Laboratório de Referência em Diagnóstico Animal do Estado do Paraná Marcos Enrietti (CDME).
- 3- Estabelecer o diagnóstico molecular de *Mycobacterium bovis*, com base na sequência do gene *rpoB* no Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN, PR).

3. REVISÃO DE LITERATURA

A Tuberculose humana é a segunda causa de morte, por doenças infecto-contagiosas no mundo, ficando atrás apenas das mortes causadas por HIV/AIDS (FRIEDEN et al., 2003). Várias pessoas conhecidas mundialmente, tais como Frédéric Chopin, Paganini, São Francisco de Assis, Noel Rosa, entre muitas outras foram vítimas desta enfermidade (DUCATI et al., 2006). O Brasil é o 15º país no mundo em casos de tuberculose e um dos 22 países responsáveis por 80% de novos casos de tuberculose no mundo (WHO, 2007).

Esta doença é causada por microorganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (*Actinomycetales*, *Mycobacteriaceae*) apresentando aproximadamente 100 espécies descritas (MATHIAS, 1988). As micobactérias causadoras de tuberculose em mamíferos fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* que inclui as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* (bacilo Calmette-Guérin BCG), *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium canettii* (HUARD et al., 2006).

As micobactérias são bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) (DORRONSORO & TORROBA, 2007). Estes bacilos foram descobertos por Robert Koch, em 1882. Isto foi um marco fundamental para o conhecimento da doença. Significou também uma importante contribuição para o fortalecimento da teoria da transmissibilidade das doenças, que vinha se desenvolvendo com as pesquisas de Pasteur e outros cientistas, além de reforçar a concepção biológica das doenças. Essa descoberta impulsionou novas tentativas em direção ao controle e tratamento específico da tuberculose, não apresentando, porém, neste contexto, avanços terapêuticos significativos (TAYLOR et al., 2003).

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria aeróbica que comumente afeta os pulmões e seu progresso é controlado pela integridade do sistema imune do hospedeiro, onde estas bactérias podem ser eliminadas ou mantidas em condição de latência. Com a falha na integridade do sistema imune do hospedeiro a doença então se desenvolve (DUCATI et al., 2006).

3.1 Tuberculose Bovina

A infecção pelo *Mycobacterium bovis* causa a tuberculose bovina. Até 1970 o bacilo tuberculoso bovino foi considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. KARLSON & LESSEL em 1970 propuseram sua classificação como espécie individual denominada *Mycobacterium bovis* (FERREIRA-NETO & BERNARDI, 1997).

A tuberculose bovina é uma doença granulomatosa crônica, que geralmente afeta os linfonôdos e o tecido pulmonar dos bovinos. O *M. bovis* tem uma identidade de genoma 99,95% compartilhada com o *M. tuberculosis* que é o agente da tuberculose humana (GORDON et al., 2001). Já passados mais de cem anos da sua descoberta, esta enfermidade continua tendo grandes impactos devido, entre outros motivos, a grande incidência nos países em desenvolvimento, sendo estes reservatórios do *M. bovis* (O'REILLY & DABORN, 1995).

O *M. bovis* é uma bactéria intracelular que infecta os macrófagos e outras células da linhagem monocítica (RUA-DOMENECH et al., 2006). Esta micobactéria afeta uma ampla variedade de hospedeiros, causando assim prejuízos econômicos para a pecuária, além de infecções atípicas em seres humanos, sendo então chamada de tuberculose zoonótica, com sistema imune comprometido (O'REILLY & DABORN, 1995).

Os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998. Um levantamento realizado em 1999, no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo foram detectadas 5% das propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu para 15% do universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção. Estima-se que os animais infectados perdem de 10% a 25% da sua eficiência produtiva (BRASIL, 2006).

O diagnóstico *post-mortem* da tuberculose causada por *M. bovis* baseia-se geralmente em exames histológicos e bacteriológicos realizados a partir de amostras teciduais. (FUVERKI et al., 2008).

3.2 Contaminações Interespecíficas

Como zoonose, suspeita-se que a infecção pelo *M. bovis* seja responsável por mais de 4 mil dentre 100 mil casos de tuberculose humana descritos anualmente no Brasil (LEITE et al., 2003). Os seres humanos parecem ser tão susceptíveis ao *M. bovis* quanto ao *M. tuberculosis*, sendo contaminados pela ingestão, inalação, ou menos freqüente, pelo contato com mucosas ou feridas com micobactérias infectantes (RUA-DOMENECH et al., 2006). A grande incidência de pessoas imunossuprimidas atualmente seja por doenças ou por tratamentos como quimioterapia e transplantes de órgãos, pode ser um dos fatores pela ocorrência desta contaminação interespecífica (MATOS et al., 2006). Infecções por *M. bovis* em seres humanos podem ser adquiridas mais comumente pelo consumo de leite e derivados crus (ACHA & SZYFRES, 2003), levando ao desenvolvimento de doença extrapulmonar (GRANGE, YATES e KANTOR, 1996).

Esta doença exerce grande importância na saúde pública sendo necessário um rígido controle por parte das agências sanitárias para o seu melhor entendimento e controle. No Estado do Paraná existem normas de controle e erradicação da doença desenvolvidas pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SEAB). Apesar de diversos estudos sobre vacinação e tratamento da tuberculose bovina, até o presente momento, os resultados obtidos não justificam a adoção dessas medidas como forma de controle da enfermidade (BRASIL, 2006; MENZIES & NEILL, 2000). Portanto é necessário um acompanhamento por meio de diagnósticos mais conclusivos a fim de se ter um rastreamento mais específico do agente causador desta enfermidade.

3.3 Métodos Diagnósticos

O diagnóstico preciso da infecção pelo *Mycobacterium bovis* de animais vivos é notoriamente problemático. A patogênese desta doença pode variar dentro da mesma espécie bem como entre espécies distintas, resultando em diferentes vias de excreção e transmissão padrões (DREWE et al., 2009).

Nestas circunstâncias, é necessário desenvolver sistemas de diagnóstico que são diretamente aplicáveis de amostras biológicas e permitir um elevado nível de realização e bons níveis de sensibilidade e especificidade, permitindo um diagnóstico rápido, no laboratório, utilizando as amostras colhidas no matadouro (PARRA et al., 2008).

Pode-se afirmar que existem métodos diagnósticos adequados para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, entretanto, não existe um método diagnóstico da tuberculose bovina que tenha uma eficácia absoluta. A prova tuberculínica, a vigilância epidemiológica em matadouros, os controles sanitários, o diagnóstico de laboratório, são todos elementos básicos que devem ser empregados com critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica (PARRA et al., 2008).

Independentemente dos métodos de diagnóstico utilizados, é fundamental que os animais positivos sejam abatidos, evitando-se, assim, a disseminação da tuberculose (FUNDEPEC, 2009).

3.3.1 Diagnóstico Clínico

Possui valor relativo, porque o animal pode estar infectado, com um foco localizado e apresentar-se aparentemente sadio. Períodos prolongados de incubação, chegando até vários anos, em algumas espécies, tais como búfalos Africano (*Syncerus caffer*), indicam que animais aparentemente saudáveis podem transportar e transmitir micobactérias patogênicas (DREWE et al., 2009). O diagnóstico clínico torna-se importante para os animais com tuberculose avançada, para os quais o teste tuberculínico perde seu valor pela possibilidade do fenômeno da anergia (Desaparecimento da capacidade de o organismo reagir a uma substância ou a um agente patogênico relativamente aos quais estava anteriormente sensibilizado) à tuberculina. Os sinais clínicos

mais freqüentes são a caquexia progressiva e a tosse seca, curta e repetitiva. Podem ser reconhecidos também sinais de broncopneumonia com tosse úmida (com presença de escarro) seguida de dispnéia e taquipnéia. Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória. Pode ocorrer linfadenomegalia localizada ou generalizada (FUNDEPEC, 2009; USDA-APHIS, 2009).

3.3.2 Tuberculinização

A tuberculinização é um teste imunológico feito em campo. Este método é utilizado para o diagnóstico da doença por ser seguro e detectar a infecção à partir da terceira semana do seu início sem a necessidade de encaminhar as amostras para laboratório (EMBRAPA, 2009). Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: a PPD bovina, procedente do *M. bovis*; e a PPD aviária proveniente do *M. avium* (MONAGHAN et al., 1994).

A metodologia do teste consiste no **Teste Cervical Simples (TCS)** observando-se as seguintes condições e critérios:

I - deve ser realizado com inoculação intradérmica de tuberculina PPD bovina, na dosagem de 0,1 ml, na região cervical ou na região escapular de bovinos, devendo a inoculação ser efetuada de um mesmo lado de todos os animais do estabelecimento de criação.

II - o local da inoculação será demarcado por tricotomia e a espessura da dobra da pele medida com cutímetro antes da inoculação;

III - após 72 horas, mais ou menos 6 horas, da inoculação, será realizada nova medida da dobra da pele, no local de inoculação da tuberculina PPD bovina (Proteína Purificada Derivada);

IV - o aumento da espessura da dobra da pele (ΔDB) será calculado subtraindo-se da medida da dobra da pele 72 horas, mais ou menos 6 horas, após a inoculação à medida da dobra da pele no dia da inoculação da tuberculina PPD bovina;

V - os resultados em bovinos serão interpretados de acordo com a Tabela 1 (BRASIL, 2006).

Tabela 1 – Interpretação do teste cervical simples em bovinos (SEAB-PR, 2006).

ΔB (mm)	Características da reação			Interpretação
	Sensibilidade	Consistência	Outras alterações	
0 a 1,9	-	-	-	negativo
2,0 a 3,9	pouca dor	endurecida	delimitada	inconclusivo
2,0 a 3,9	muita dor	macia	exsudato, necrose	positivo
$\geq 4,0$	-	-	-	positivo

Apesar de ser seguro, o teste da tuberculina apresenta algumas limitações. Podem ocorrer reações inespecíficas pelo contato prévio com outras micobactérias ambientais resultando em falso positivo. Não reatividade levando a falsos negativos, decorrentes de infecções recentes, mau estado geral de saúde, imunossupressão pós parto entre outras (MONAGHAN et al., 1994) e reações cruzadas também com outros patógenos não relacionados como *Corynebacterium* e *Nocardia* spp. (ROMERO et al., 1999).

3.3.3 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado mediante o isolamento e a identificação do agente por métodos bacteriológicos. Amostras frescas podem ser fixadas em lâmina e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen para a pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), contudo, a sensibilidade do método é baixa, e um resultado positivo sugere fortemente tratar-se de micobactéria, mas não informa a espécie (VARELLO et al., 2008).

Essa mesma coloração pode ser empregada para colônias isoladas em meios de cultura. Muitas características, inclusive a propriedade tintorial, superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*, tornando difícil, em alguns casos, a diferenciação entre ambos. O diagnóstico bacteriológico por isolamento requer um longo período de incubação (30 a 90 dias), pois o *M. bovis* cresce lentamente em meios de cultura artificiais. Para permitir o isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* sp, recomenda-se a

semeadura concomitante nos meios de cultura Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie (RIBEIRO, 2006).

Segundo Grange et al. (1996), com base nas características morfológicas da cultura e pelo perfil bioquímico é possível diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. O *M. bovis* tem seu crescimento dificultado em meios que contenham glicerol, sendo essa uma característica importante para diferenciação entre os dois microrganismos. Algumas cepas de *M. bovis* crescem exclusivamente em meios de cultura que possuem suprimento de piruvato ao invés de glicerol e outras não possuem tanta especificidade por este suprimento. Devido este fato a necessidade do cultivo do material biológico nestes dois meios, sendo o Löwenstein-Jensen apresentando um suprimento de glicerol e Stonebrink-Lesslie um suprimento de piruvato.

3.3.4 Diagnóstico *post mortem*

O diagnóstico anatomo-patológico, ou *post mortem*, da tuberculose bovina ocorre durante a necropsia ou na análise pela inspeção sanitária de carcaças em frigoríficos-matadouros. É um diagnóstico que apresenta certa dificuldade, pois, muitos processos inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para tuberculose, ou seja, lesões nodulares com 1 mm a 2 cm de diâmetro, confluentes ou não, de cor amarelada, envolvida por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto caseoso ou purulento no seu interior (SALAZAR, 2005).

Estas lesões estão presentes em infecções causadas por outros microorganismos, tais quais, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, por fungos, na infestação por larvas de parasitos e até por alguns processos neoplásicos (SALAZAR, 2005; CORNER, 1994).

Cerca de 70 a 90% destas lesões presuntivas, encontradas em abatedouros-frigoríficos, para tuberculose bovina ocorrem nos linfonodos da cabeça (Sublingual, carotídeo e retrofaríngeo), e da cavidade torácica (mesentérico, mediastínico ou brônquico e hepático). Do total de lesões em carcaças abatidas com lesão presuntiva para tuberculose bovina, em regiões com alta prevalência da doença, como países em desenvolvimento com uma

grande quantidade de rebanho bovino como o Brasil e a Índia, 47% são de fato tuberculosas (SALAZAR, 2005; CORNER, 1994; MENZIES & NEILL, 2000).

3.3.5 Diagnóstico Histopatológico

O diagnóstico histopatológico consiste na análise de lesões presentes em materiais colhidos geralmente *post mortem* (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006).

A metodologia clássica consiste na fixação das amostras de tecido com lesões características em formol, geralmente a 10%. Após este processo de fixação as amostras são inseridas em blocos de parafina de acordo com metodologias padrão. As amostras que possuem lesões fortemente calcificadas passam por um processo de descalcificação para facilitar no preparo dos cortes histológicos. São efetuados cortes com cerca de 2 micrômetros, para o preparo das lâminas histológicas que serão coradas. O método clássico de coloração de micobactérias é o Ziehl-Nielsen ou método de coloração a quente e sua variante Fite Faraco (CARSON & HLADIK, 2008). Nesta metodologia as lâminas histopatológicas são coradas com o corante Fucsina e Azul de Metileno (VARELLO et al., 2008).

Nesta técnica os bacilos, forma das micobactérias, são visualizados como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos corados em vermelho com o fundo azul (BRASIL, 2005).

3.3.6 Diagnóstico Molecular

Métodos moleculares de diagnósticos possuem grande importância para um estudo epidemiológico da tuberculose, tanto bovina como humana. Técnicas de tipagem molecular, que detectam polimorfismos na micobactéria tem sido usadas em estudos epidemiológicos de transmissão da tuberculose (BORSUK et al., 2005).

A identificação molecular de espécies do gênero *Mycobacterium* possui duas principais vantagens em comparação com as técnicas fenotípicas de identificação (tais como os métodos de diagnósticos aqui citados): ser uma

ferramenta de identificação rápida e uma exata identificação diferencial de espécies do gênero *Mycobacterium* (MOHAMED, EL-ELLA e NASR, 2009).

A maioria das abordagens moleculares utilizadas é baseada na conservação da sequência de DNA que codifica a subunidade menor (16S) do RNA ribossomal (rRNA). Existem ainda estudos de polimorfismos de *lôcus* de repetições diretas (DR) (técnica de *spoligotyping*), análises de números variáveis de repetições em *tanden* (MIRU-VNTR) e análises das regiões de deleção do genoma da micobactéria pelo método de reação em cadeia da polimerase (BORSUK et al., 2005; HUARD et al., 2006; KWARA et al., 2003; KAMERBEEK et al., 1997). Técnicas de seqüenciamento do gene codificador da subunidade β da RNA polimerase (*rpo* β) das bactérias também são largamente utilizadas como método diagnóstico molecular de micobactérias (ADÉKAMBI, DRANCOURT e RAOULT, 2008).

Para a análise molecular de amostras a partir de lesões granulomatosas contaminadas pelo *M. bovis* é necessário que a escolha do método de extração de DNA seja feita com maior cuidado, pois se trata de uma bactéria intracelular. Portanto é necessário usar técnicas de extração como a descrita por BOOM et al.(1990), devido à diminuição da presença de fatores de inibição de amplificação (como enzimas de degradação de DNA presentes no tecido dos animais abatidos) proporcionada por esta técnica (RIBEIRO, 2006).

3.3.7 Novas Metodologias de Diagnóstico

Ainda não existe uma vacina eficaz contra a Tuberculose tanto humana quanto bovina e o diagnóstico ainda depende da baciloscopia, que tem apenas 60% a 70% de sensibilidade. O longo tempo necessário de incubação da cultura para micobactéria e os esquemas atuais de tratamento, tanto da doença quanto da infecção latente, são insatisfatórios por serem prolongados e apresentarem efeitos adversos em diferentes populações que dificultam o seu manuseio (KRITSKI et al., 2007).

Novas metodologias de diagnóstico possibilitarão um avanço no número de diagnósticos, possibilitando assim um melhor tratamento e acompanhamento de pessoas infectadas. Com isso espera-se que o

diagnóstico chegue a 70% das pessoas infectadas e o tratamento alcance cerca de 85% destas pessoas (WHO, 2007). Os avanços estão se baseando na melhoria dos métodos antigos e na apresentação de novos métodos.

Os avanços na microscopia buscam na utilização da microscopia de fluorescência, com os corantes auramina–rodamina, melhorar a sensibilidade na detecção das micobactérias (STEINGART et al., 2006).

Nos testes de cultivo bacteriano, teste padrão para o diagnóstico, os esforços buscam acelerar o tempo de resultado. Em meio de cultivo sólido, padrão utilizado na maioria dos laboratórios de diagnóstico de tuberculose, este teste tem um tempo de resposta de 4 a 6 semanas. Nos meios líquidos o tempo desta resposta alcança de 1 a 3 semanas. Além de diminuir o tempo de resposta, os novos métodos de cultivo em meio líquido podem ser automatizados possibilitando um maior número de diagnóstico em menor tempo (GARRIGO et al., 2007).

Outro tipo de diagnóstico, que os avanços são demonstrados pela automatização para um melhor resultado, são os baseados em conceitos de Biologia Molecular. São muitos os kits comerciais e cada um utiliza um método diferente para amplificar regiões específicas de DNA das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Entre eles podemos citar o GenProbe Amplified M. tuberculosis Direct test (AMTD)®, o Roche Amplicor MTB test®, o Cobas Amplicor test®, Abbott LCx test® e o BD-ProbeTec (SDA) test® (LING et al., 2008).

Porém muitos pesquisadores vêm nos métodos de diagnósticos imunológicos como grande possibilidade de suprir as necessidades dos métodos atuais (MUKHOPADHYAY et al., 2006; TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007) . Os testes imunológicos baseiam-se no conceito de que células T de indivíduos previamente sensibilizados por antígenos do *M. tuberculosis* liberam IFN- γ quando reestimuladas por antígenos específicos. Este teste, ao contrário do teste cutâneo com o PPD, é realizado *ex vivo*, ou seja, através da cultura de uma amostra de células do sangue periférico do paciente, por 24 h, em presença de antígenos do *M. tuberculosis* (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007). Conseqüentemente, as células sensibilizadas e específicas produzem e secretam IFN- γ no sobrenadante da cultura, que pode ser posteriormente

detectado por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA) (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007).

Estes testes parecem oferecer a possibilidade de melhorar a detecção e são adequados para áreas com recursos limitados. As principais vantagens destes testes diagnósticos com base imunológica são a velocidade (os resultados podem estar disponíveis dentro de horas) e simplicidade (STEINGART et al., 2007), em comparação com os outros testes aqui citados.

Apesar de a tuberculose ser uma doença antiga, ainda causa muitos danos e transtornos para a saúde pública e animal. Ainda que possua tratamento, a erradicação da tuberculose está mais relacionada a ações que visem um diagnóstico mais rápido e eficaz, possibilitando assim traçar ações mais efetivas de combate.

4. METODOLOGIAS

4.1 Animais e Amostras

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias desta Universidade sob protocolo 008/2008.

Foram utilizados 35 bovinos (*Bos taurus*), 34 vacas da raça holandesa e 1 boi da raça Angus, submetidos ao teste de tuberculina bovina, apresentando resultados positivos, indeterminados e negativos, encaminhados para o abatedouro Frigorífico Argus Ltda. (Serviço de Inspeção Federal nº 1710) de São José dos Pinhais, Paraná. O abate foi realizado no dia 30/04/2008, segundo normas da SEAB para procedimentos de abate sanitário.

As amostras utilizadas foram cortes de pulmão, linfonôdos da cabeça (sublingual, carotídeo e retrofaríngeo), linfonôdos da cavidade torácica (mesentérico, mediastínico ou brônquico e hepático) e sangue total para a obtenção de soro. No momento da coleta foi feito um exame macroscópico dos pulmões e linfonôdos para a localização de granulomas sendo dada a preferência para a coleta de amostras que apresentam lesões granulomatosas. As amostras foram acondicionadas em recipientes com gelo para o seu transporte.

4.2 Preparo das Amostras

As amostras foram separadas em 2 partes, cada parte contendo material de todas as amostras, uma parte foi encaminhada ao Laboratório de Patologia Veterinária (Hospital Veterinário/Dep. de Medicina Veterinária/UFPR) e a outra parte encaminhada para o Centro de Diagnóstico Marcos Enretti (CDME), ao Laboratório de Bacteriologia, para cultivo bacteriano. O material entregue ao CDME foi homogeneizado, descontaminado com solução de NaOH 4 % e posteriormente neutralizadas com solução de HCl 1,0 N (Método de Petroff),.

Após a neutralização, os sedimentos formados foram separados. Uma parte foi semeada em tubos contendo meio de cultura sólido de *Lowenstein-Jensen* e outra parte para cultivo em meio de cultura sólido *Stonebrink*. As culturas foram incubadas a 37 °C e controladas semanalmente para verificar o crescimento de colônias durante 40 a 60 dias (BRASIL, 2005). A visualização dos bacilos álcool-ácido resistentes foi realizada por baciloscopia, das amostras que apresentaram crescimento na cultura em coloração de Ziehl-Nielsen, segundo técnica do Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005). A outra parte teve seu DNA extraído segundo dois protocolos. Uma parte das amostras teve seu DNA extraído através da técnica de quente-frio, que consiste de três ciclos de 30 minutos a 94 °C e 30 minutos a -20 °C para inativação do agente e liberação do material genético. As outras amostras tiveram o seu DNA extraído pelo método clássico Fenol/Clorofórmio/Etanol (segundo Procedimento Operacional Padrão do CDME). Neste caso as amostras foram tratadas por um tampão de extração (Tris Base 2M; EDTA 0,5M; SDS 10%; Proteínas K 10 mg/mL e H₂O ultra pura q.s.p.) por 16/24h em uma temperatura de 37° C. Após este período foi adicionado 500 µL de fenol saturado e então homogeneizado em vórtex por 5-10 s. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min, a fase líquida (superior) foi transferida para um novo tubo. Foi adicionado novamente Fenol e centrifugada com a mesma velocidade. A fase líquida foi transferida para outro tubo onde foi adicionado 1-2 volumes de Clorofórmio a 20° C negativos. Após nova homogeneização e centrifugação a fase líquida superior foi transferida para um novo tubo de 1,5µL. O DNA foi precipitado com acetato de sódio e isopropanol a temperatura ambiente e centrifugado imediatamente numa microcentrífuga refrigerada. O sedimento formado (pellet) foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 150µl de uma solução Tris EDTA contendo a enzima RNase (50ug/ml).

O DNA das amostras que passaram pelos 40-60 dias de cultivo também foi processado após este período da mesma forma que a descrita anteriormente.

4.3 Histopatologia

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária (Hospital Veterinário/Dep. de Medicina Veterinária/UFPR) e

seccionadas de maneira que cada fragmento de lesão se constituísse de todas as camadas do granuloma, isto é, a transição entre a lesão e o tecido aparentemente normal, a cápsula e o tecido necrótico. Após este processo, cada secção foi acondicionada em recipientes plásticos de boca larga, contendo formol tamponado a 10% em uma quantidade na qual todo o material estivesse embebido na solução.

Depois de fixadas, as amostras foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e microtomizados a 4 micrômetros, obtendo-se duas lâminas histológicas de cada bloco. As lâminas fixadas foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina, com o objetivo de se visualizar alterações histopatológicas e coloração Fite-Faraco, com o objetivo de visualizar bacilos álcool-ácido resistentes (CARSON & HLADIK, 2008).

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para todos os protocolos de PCR foram preparadas reações com volume final de 50 µl, contendo 5 µl (1/10 do volume total) de tampão 10X Taq DNA Polimerase, MgCl₂ a 1,5 mM, 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmoles de cada oligonucleotídeo (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5 µl de DNA extraído. Foi utilizado 0,25 µl (equivalentes a 1 unidade) de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para cada reação. O volume final foi obtido com acréscimo de água ultrapura. A PCR para a identificação foi realizada de acordo com Adekambi et al. (2003). Foram utilizados os *primers* MycoF (5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3', localizado da base 2573 a 2592) e MycoR (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3', localizado da base 3316 a 3337) localizados em duas regiões conservadas e flanqueando a região mais variável do gene *rpoB*. Este par de *primer* amplifica uma região de 764 pares de bases em isolados clínicos.

Todas as reações foram acompanhadas por um controle da reação ou branco (5 µl de água ultrapura) e um controle positivo (5 µl de DNA de *M. bovis* cepa ATCC 19210). A amplificação consistiu de 35 ciclos, com uma desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento do *primer* a 64 °C por 30

segundos e extensão do DNA a 72°C por 90 segundos. O programa de amplificação apresenta uma desnaturação inicial de 95°C por 1 minuto e termina com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

O padrão dos produtos de amplificação de todas as reações foi obtido por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, impregnados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados com transiluminador ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação.

4.5 Sequenciamento

As amostras foram enviadas para MacroGen Inc. (Shipping Address: MacroGen Inc. - 908 World Meridian Center. 60-24 Gasan-dong; Geumchun-gu Seoul, Korea 153-023) e sequenciadas pelo método de Single Extension, usando-se fluorescentes específicos Big Dye Terminator cycle sequencing kit v. 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos foram detectados utilizando o sistema Automatic Sequencer 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, USA). As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank utilizando-se o BLAST (*basic local alignment tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e alinhadas com seqüências selecionadas de cepas ATCC com o programa BioEdit versão 7.0.9 (Tom Hall Ibis Biosciences a subsidiary of Isis Pharmaceuticals 1891 Rutherford Road Carlsbad, CA 92008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tuberculinização

A partir do exame clínico é feita a seleção de animais com sintomas suspeitos aos de tuberculose, tais como a caquexia progressiva e a tosse seca, curta e repetitiva. Podem ser reconhecidos também sinais de broncopneumonia com tosse úmida (com presença de escarro) seguida de dispnéia e taquipnéia. Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória (USDA-APHIS, 2009).

Por meio desta análise foram constatados 35 animais suspeitos de tuberculose na região Centro oriental do estado do Paraná. Estes animais foram submetidos ao teste de tuberculina e os resultados estão descritos no Quadro 1 do segundo capítulo desta dissertação.

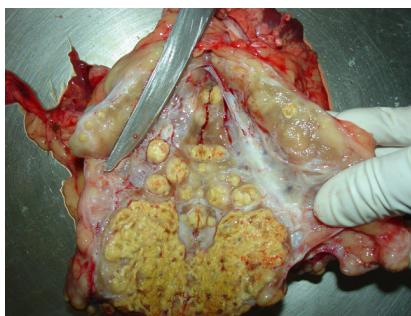
No Quadro 1 é possível identificar testes com resultado inconclusivo, demonstrando a limitação deste método diagnóstico e a necessidade da utilização de métodos complementares para um resultado conciso (MONAGHAN et al., 1994, ROMERO et al., 1999). De acordo com as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) animais que apresentem resultados positivos e inconclusivos devem ser encaminhados para abate sanitário, bem como animais próximos aos que apresentaram estes resultados (BRASIL, 2006). Portanto estes 35 bovinos foram encaminhados para este processo de abate sanitário de acordo com as normas do PNCEBT.

5.2 Análise Macroscópica *post mortem*

No momento da realização do abate foram colhidos fragmentos, *post mortem*, de diferentes linfonodos e órgãos, buscando a presença de lesões com processos inflamatórios granulomatosos de cor amarelada envolvida por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto caseoso ou purulento no seu interior (SALAZAR, 2005) como apresentada na Figura 3. Como forma de controle foram coletados também os linfonodos, mandibulares, carotídeos e retrofaríngeos, preconizados (BROWN e de ANDA, 1998) para o controle de infecção da tuberculose independente da presença ou ausência de lesão. Os

resultados desta análise estão descritos na coluna intitulada MACRO no Quadro 2 do segundo capítulo desta dissertação.

Figura 1: Amostra de pulmão/linfonodo mediastínico com lesão sugestiva de tuberculose.



No total foram coletados 35 linfonodos carotídeos, 21 linfonodos dos Pulmões e/ou linfonodo mediastínico ou brônquico, 5 pedaços de Fígado e/ou linfonodos hepáticos, 14 linfonodos Mesentéricos, 22 linfonodos retrofaríngeos e 10 linfonodos sublinguais, sendo assim 107 amostras. Cada amostra foi seccionada e encaminhada para testes histopatológicos, de cultura e molecular.

5.3 Análise Histopatológica

A análise histopatológica é um teste utilizado para auxiliar nos dados obtidos da análise macroscópica, detectando o granuloma, considerando a lesão característica desta doença (CASSIDY et al., 1999). As amostras foram coradas através da técnica de Hematoxilina-Eosina, para analisar a presença de lesões sugestivas de tuberculose e presença de micobactérias pela técnica de Fite-Faraco.

De acordo com o Quadro 2 do segundo capítulo desta dissertação, podemos correlacionar os resultados das 3 análises diretas dos tecidos. Vale ressaltar a necessidade de estabelecer em conjunto estas técnicas bem como a análise da tuberculina, para se obter um resultado mais adequado e rápido.

Analizando detalhadamente o quadro obtemos relações como a amostra 22, apresentando resultado inconclusivo para o teste da Tuberculina, porém com lesões macroscópicas presuntivas de tuberculose e exame histopatológico positivo para a presença de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR). Casos como das amostra 7, 28 e 34 que apresentam resultado negativo para o teste da tuberculina porém positivo no teste de Fite-Faraco demonstra a falibilidade do teste intradérmico.

5.4 Cultivo Bacteriológico

Cada uma das 107 amostras foi processada para o cultivo bacteriológico no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME). Esta técnica é o diagnóstico definitivo da tuberculose pois realiza o isolamento e a identificação do BAAR através das características morfológicas e perfil bioquímico da cultura (GRANGE et al. 1996).

As amostras foram descontaminadas através do método de Petroff, e primeiramente encaminhadas para cultivo em meio de cultura sólido Lowenstein-Jensen conforme metodologia padrão do CDME. Passados 60 dias da inoculação houve crescimento de cultura com característica morfológica presuntiva de tuberculose apenas na amostra de número 35. Foram selecionadas novamente apenas as amostras com a presença de BAAR para novamente serem encaminhadas para o cultivo bacteriológico, totalizando 24 amostras. Novamente não houve crescimento de cultura com característica morfológica presuntiva de tuberculose.

Num primeiro momento foi pensado na possibilidade de se tratar de outro tipo de micobactéria, pois resultados com histologia positiva deve-se atentar para a possibilidade da presença de outras micobactérias (MILIAN-SUAZO et al. 2000). Também há a possibilidade de que o baixo número de bactérias encontradas na lesão no momento da coleta pode ter contribuído para o baixo índice de isolamento (WATRELOT-VIRIEUX et al. 2006).

Para tentar a solução deste problema foi trocado o meio de cultura bacteriológica, utilizando então o meio de cultura sólido Stonebrink o qual possui como fonte de carbono o piruvato e não o glicerol como é o caso do meio Lowenstein-Jensen, esta diferença é fundamental no isolamento de cepas

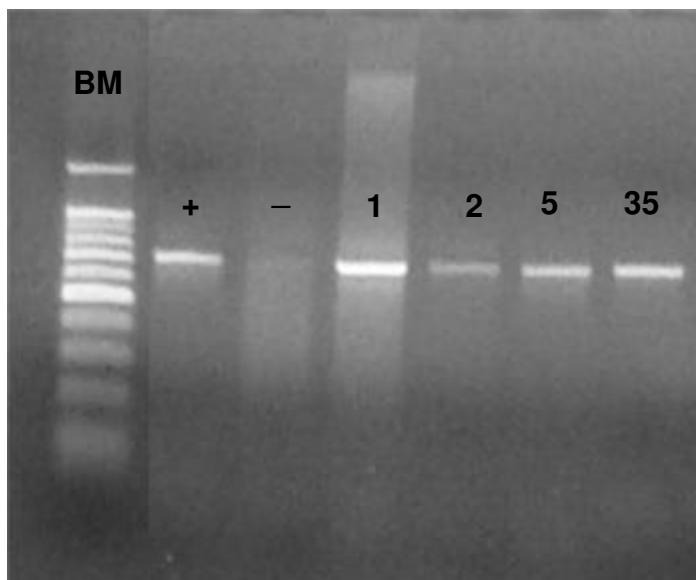
de *M. bovis* (que utilizam piruvato) e *M. tuberculosis* (que utilizam glicerol) (RIBEIRO, 2006). Com este novo meio de cultura foram feitos de cada um dos 35 linfonodos carotídeos e houve o crescimento de cultura presuntiva de *M. bovis* nas amostras 1, 2, 5 e da amostra 35 com crescimento no meio Lowenstein-Jensen.

5.5 Análise Molecular

Para a análise molecular foi utilizada a metodologia de análise do gene, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (*rpo β*). Foram selecionadas as amostras dos linfonodos carotídeos para desenvolver esta metodologia. O seu DNA foi extraído em dois momentos. O primeiro momento foi sem o isolamento da cultura, sendo extraído DNA do tecido intacto através da técnica de Fenol-Clorofórmio. Nesta análise não foi possível a amplificação do DNA, fato este esperado pela dificuldade de se obter quantidade de DNA suficiente para amplificação na metodologia de PCR e devido a complexidade da parede celular das micobactérias ricas em lipídeos (ACHA e SZYFRES, 2003).

O segundo momento foi feita a extração de DNA das amostras que obtiveram crescimento no meio de cultura *Lowenstein-Jensen* (amostra 35) e *Stonebrink* (amostras 1, 2 e 5). A extração pelo método quente e frio não obteve resultado satisfatório, resultando na não amplificação do DNA pela PCR, enquanto que a extração de DNA pelo método clássico de Fenol-Clorofórmio obteve um resultado satisfatório conseguindo a amplificação da região do gene *rpo β* como mostra a Figura 4.

Figura 2: Amplificação do gene *rpoB* onde os números 1, 2, 5 e 35 correspondem as amostras de mesmo número, o símbolo – representa o controle negativo, o símbolo + representa o controle positivo (*M. bovis* cepa ATCC 19210) e BM corresponde ao marcador de massa molecular.



O produto desta PCR foi purificado e encaminhado para o seqüenciamento, usando as metodologias descritas no ponto 4 desta dissertação.

O seqüenciamento da amostra 1 mostrou um fragmento com 746 nucleotídeos, a amostra dois 728 nucleotídeos, a amostra 5 743 nucleotídeos e a amostra 35 apresentou um fragmento de 742 nucleotídeos. Quando realizamos as análises pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) obtemos para todas as amostras o mesmo resultado, que esta apresentado no Quadro 4.

Quadro 4. Análise através do programa BLAST mostrando uma máxima identidade com várias espécies de micobactérias.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP001658.1	Mycobacterium tuberculosis KZN 1435, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
AP010918.1	Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 DNA, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
CP000717.1	Mycobacterium tuberculosis F11,	1304	1304	97%	0.0	99%	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	complete genome						
CP000611.1	Mycobacterium tuberculosis H37Ra, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
AM408590.1	Mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P2, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
AE000516.2	Mycobacterium tuberculosis CDC1551, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
BX842574.1	Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 3/13	1304	1304	97%	0.0	99%	
BX248336.1	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complete genome; segment 3/14	1304	1304	97%	0.0	99%	
U12205.1	Mycobacterium tuberculosis H37Rv RNA-polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1304	1304	97%	0.0	99%	

Quando estas amostras são analisadas entre si através do programa BioEdit (Sequence Alignemet Editor) obtemos uma máxima identidade entre si e o controle positivo da reação (*M. bovis* cepa ATCC 19210).

Esta alta conservação deste gene auxilia na escolha de um tratamento mais adequado, podendo ser utilizada a rifampicina como medicamento. Isto demonstra também que a utilização do gene *rpoB* para a caracterização de subtipos de *M. bovis* nesta região não é recomendada.

6. CONCLUSÕES

Nas análises macroscópicas foi possível detectar que animais com resultados inconclusivos para o teste de tuberculina apresentam lesões visíveis e tem grande chances de serem positivos para Tuberculose.

A análise Histopatológica em conjunto com a análise macroscópica são bons métodos auxiliares para obter resultado rápido e confiáveis.

Apesar de a cultura ser o método diagnóstico definitivo é preciso cuidado na hora da coleta, transporte, acondicionamento e processamento para evitar contaminações.

O seqüenciamento do gene *rpoβ* apresentou uma alta conservação nestas amostras não sendo possível caracterizar subtipos distintos de *M. bovis* em uma mesma propriedade.

7. REFERÊNCIAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. v. 1. Bacterioses and Mycoses. 3 ed. Washington D. C.: Pan American Health Organization, 2003, 384 p.

ADÉKAMBI, T.; COLSON, P.; DRANCOURT, M. *rpoB*-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 41, n. 12, p. 5699-5708, 2003.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDA J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M. M.; MADEIRA, S. G.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTI, O. A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with high incidence of tuberculosis. **Microbes and Infection**. v. 7, n. 13 p. 1338-1344, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Departamento Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) [on line]**, 2006. Disponível: <<http://www.agricultura.gov.br>> [capturado em 12 jun. 2009].

BRASIL. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do estado do Paraná. **Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) [on line]**, 2006. Disponível:

<http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/regulamento_pecebt.pdf>
[capturado em 13 mai. 2009].

BROWN, W.H. e de ANDA, J.H. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 212, p. 557-559, 1998.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; GRIFITH D.E.; WALLACE, R.J. Jr. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 15, n. 4, p. 716–746. 2002.

CARSON, F.L., HLADIK, C. Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3.ed. **American Society for Clinical Pathology** (ed). 2008.

CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; EVANS, R. T.; FORSTER, F.; NEILL, S. D. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. **Journal of Comparative Pathology**. v. 121, n. 4, p. 321-337, 1999.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; RAY BUTLE, W. R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1305–1314, 2003.

DREWE, J. A.; DEAN, G. S.; MICHEL, A. L.; PEARCE, G. P. Accuracy of three diagnostic tests for determining *Mycobacterium bovis* infection status in live-sampled wild meerkats (*Suricata suricatta*). **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**. v. 21, p. 31-39, 2009.

DUCATI, R. G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 5, p. 977-81, 1990.

EMBRAPA. **Folhetim explicativo sobre Tuberculose bovina**. Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2006/f-07.pdf> [capturado em 18 Jan. 2009]

FRIEDEN, T. R.; STERLING, T. R.; MUNSIFF, S. S.; WATT, C. J.; DYE, C. Tuberculosis. **The Lancet**, London, v.362, p. 887-899, 2003.

FUNDEPEC, PR. Tuberculose. **Fundo de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Paraná**. Disponível em <http://www.fundepecpr.org.br/?pag=tuberculose_diagnostico> [capturado em 10 Fev. 2009].

GOODCHILD, A. V.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. **Tuberculosis**. v. 81 (1/2), p. 23–41, 2001.

GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in Human beings. **Tuberculosis**, v. 81, p. 71-77, 2001.

GRANGE, J.M., YATES, M.D., KANTOR, I.N. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **World Health Organization**. 2.ed. 23p. 1996.

GRIFFIN, J.F.T.; RODGERS, C.R.; LIGGETT, S.; MACKINTOSH, C.G. Tuberculosis in ruminants: Characteristics of intra-tonsilar *Mycobacterium bovis* infection models in cattle and deer. **Tuberculosis**. v. 86, p. 404–418, 2006.

HUARD, R. C.; LAZZARINI, L. C. O.; BUTLER, W. R.; SOOLINGEN, D.; HO, J. L. pcr-Based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.

HUARD, R. C.; FABRE, M.; HAAS, P.; LAZZARINI, L. C. O.; SOOLINGEN, D.; COUSINS, D.; HO, J. L. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n.12, p.4271-4287, 2006

HOWARD, S. T; BYRD, T. F. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. **Microbes and Infection**. v. 2, p. 1845-1853, 2000.

KHARE, S.; HONDALUS, M. K.; NUNES, J.; BLOOM, B. R.; ADAMS, L. G. *Mycobacterium bovis* $\Delta leuD$ auxotroph-induced protective immunity against tissue colonization, burden and distribution in cattle intranasally challenged with *Mycobacterium bovis* Ravenel S. **Vaccine**. v. 25, p. 1743–1755, 2007.

KWARA, A.; SCHIRO, R.; COWAN, L. S.; HYSLOP, N. E.; HARRISON, S. R.; KISSINGER, P.; DIEM, L.; CRAWFORD, J. T. Evaluation of the Epidemiologic Utility of Secondary Typing Methods for Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 6, p. 2683-2685, 2003.

KOTSAN, A. Técnicos Investigam Infecções Hospitalares em Curitiba. **Gazeta do Povo on-line**. Disponível em <<http://portal.rpc.com.br/gazetadopovo/parana/conteudo.phtml?tl=1&id=727531&tit=>> [capturado em 15 abr. 2008]

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.3, p.319-323, 2003.

LUGTON, I. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. **Immunology and Cell Biology**. v. 77, p. 364–372, 1999.

MATTHIAS, D. Infecções por Micobactérias. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. 1. ed. São Paulo: Rocca, p. 261-289, 1988.

MATTOS, I. G.; RIBEIRO, M. O.; NETTO, I. C. O.; AZEVEDO, P. A. Tuberculosis: A study of 111 cases in na área of high prevalence in the extreme south of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 10, n. 3, p. 194-198, 2006.

MEIKLE, V.; SCHNEIDER, M.; AZENZO, G.; ZUMÁRRAGA, M.; MAGNANO G.; CATALDI A. Individual Animals of a Cattle Herd Infected with the Same *Mycobacterium bovis* Genotype Shows Important Variations in Bacteriological, Histopathological and Immune Response Parameters. **Zoonoses Public Health**, v. 54, p. 86–93, 2007.

MENZIES, F.D. e NEILL, D. Review – Cattle-to-cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. **The Veterinary Journal**., v.160, p. 92-106, 2000.

MILIAN-SUAZO, F., SALMAN, M.D., RAMIREZ, C., PAYEUR, J.B., RHYAN, J.C. & SANTILLAN, M. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61,p. 86-89, 2000.

MOHAMED, A. M.; EL-ELLA, G. A. A.; NASR, E. A. Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v.21, p. 48–52, 2009.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.111-124, 1994.

NAKATANI, S. M. Detecção Molecular do *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* em Amostras de Sangue de Pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Curitiba, 2002. 96 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

O'REILLY, L.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Diseases**, v. 76, sup. 1, p.1-46, 1995.

PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; HERMOSO DE MENDOZA, J. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 315-324, 2008.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The Veterinary Journal**. v. 163, p. 115-127, 2002.

POLLOCK, J. M.; POLLOCK, D. A.; CAMPBELL, D. G.; GIRVIN, R. M.; CROCKARD, A. D.; NEILL, S. D.; MACKIE, D. P. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations *post-Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Immunology**. v. 87, p. 236-241, 1996.

RIBEIRO, D. C. Comparação de Protocolos de Extração de DNA para Detecção de *Mycobacterium bovis* Através da PCR em Homogeneizados de Órgãos Bovinos. São Paulo, 2006. 55 p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ROMERO, R.E.; GARZÓN, D.L.; MEJÍA, G.A.; MONROY, W.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical

samples by PCR species-specific primers. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.63, p.101-106, 1999.

RUA-DOMENECH, R. DE LA; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 190-210, 2006.

SCARPARO, C.; PICCOLI, P.; RIGON, A.; RUGGIERO, G.; NISTA, D.; PIERSIMONI, C. Direct Identification of Mycobacteria from MB/BacT Alert 3D Bottles: Comparative Evaluation of Two Commercial Probe Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.9, p. 3222-3227, 2001.

SEAB, PR. Regulamento técnico do programa estadual de controle e erradicação da Brucelose e da Tuberculose animal. **Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná**. Disponível em <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/regulamento_pecebt.pdf> [capturado em 20 Dez. 2008].

SUÉCIA. Nobel Prize. **Nobel Lecture**. Disponível: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1901> [capturado em 14 set. 2007].

TAYLOR, G. M.; STEWART, G. R.; COOKE, M.; CHAPLIN, S.; LADVA, S.; KIRKUP, J.; PALMER, S.; YOUNG, D. B. Koch's Bacillus – a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. **Microbiology** . v. 149, p. 3213-3220. 2003.

USDA-APHIS. Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) Surveillance Standards 11/2001. **United States Department of Agriculture -Animal and Plant Health Inspection Service**. Disponível em <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/tuberculosis/downloads/bovine-tb.pdf> [capturado em 12 Fev. 2009].

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA, E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**. v. 20, p. 164-169, 2008.

VIANA-NIERO, C.; LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; RABELLO, M. C. S.; MARSOLA, L. R.; BRILHANTE, V. C. R.; DURHAN, A.; LEÃO, S. C. Molecular Characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in Isolates Collected from Outbreaks of Infections after Laparoscopic Surgeries and Cosmetic Procedures. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 3, p. 850-855, 2008.

WHO. World Health Organization. **WHO 2007 Report. Global Tuberculosis Control**. Disponível:

<http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/bra.pdf>

[capturado em 10 de mai. 2009].

WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y.; BELLI, P. Comparison of Three Diagnostic Detection Methods for Tuberculosis in French Cattle. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 53(B), p. 321–325, 2006.

ZHANG, S.-L.; SHEN, J.-G.; SHEN, G.-H.; SUN, Z.-Q.; XU, P.-H.; PENG, Y.-L.; YANG, Z.-R.; SUN, Q. Use of a novel multiplex probe array for rapid identification of *Mycobacterium* species from clinical isolates. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 23, p.1779–1788. 2007

ANEXOS

**MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Mycobacterium tuberculosis* IN TAPIRS (*Tapirus terrestris*)
FROM THE CURITIBA ZOO, PARANÁ.**

Patrícia Sayuri Murakami¹, Manoel Lucas Javorouski², Marcelo Bonat², Oneida Lacerda², Sonia Regina Brockelt³, Sonia Maria Biesdorf⁴, Sueli Massumi Nakatani³, Irina Nastassja Riediger³, Renata Benício Neves Fuverki¹, Janaína Biava⁵, Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani¹, Ivan Roque de Barros Filho¹, Luiz Felipe M. Cavazzani¹, Alexander Welker Biondo¹.

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná; Rua dos Funcionários 1540, Curitiba-PR 80035-050, abiondo@uiuc.edu; ²Zoológico Municipal de Curitiba; ³Laboratório Central do Estado - LACEN-PR; ⁴Centro Diagnóstico Marcos Enrietti - CDME; ⁵Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP.

The *Mycobacterium tuberculosis* Complex includes *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* and its diagnosis may be difficult in wild animals as there is no standard protocol for these species. Moreover, diagnosis in some wild species may not be efficient using traditional methods. Clinical diagnosis, particularly in tapirs (*Tapirus terrestris*), may also be challenging since tuberculin tests are unclear and clinical signs varies from non-specific signs to fast breathing, respiratory dyspnea and presence of granulomatous injuries. In June 2006, two of the four tapirs of the Curitiba Zoo presented episodes of chronic non-productive cough and discrete hyperthermia. Bacterial culture was carried out from bilateral serous samples obtained by nasal swabs in two tapirs, and polimerase chain reaction (PCR) performed on extracted DNA from original sample. Although culture was non-productive and presented only growth of opportunist bacteria, PCR was weakly positive for one of the samples following a general protocol for detection of *M. tuberculosis* Complex. Unfortunately, extracted DNA was not enough for more specific PCR protocols. New collection was scheduled in November, 2006 and included sedation, anesthesia and endoscopy of the same two tapirs with samples obtained by bronchoalveolar lavage (BAL). Samples were placed in ice and taken to the Marcos Enrietti Center of Diagnosis (CDME) and Central Laboratory of Paraná State (LACEN-PR) and submitted to culture, bacilloscopy and PCR. Bacilloscopy and PCR were performed directly from BAL and resulted negative for both animals. All bacterial culture but one were negative, after 40 days of incubation, and presented excessively bacterial contamination. PCR in this positive culture sample showed positive results for *M. tuberculosis* Complex and also for *Mycobacterium tuberculosis*, with amplicon of predicted size. In our opinion, negative PCR results obtained from BAL samples were probably caused by inflammatory cells and bacterial contamination in these samples. Although *Mycobacterium tuberculosis* in zoo animals is known to be caused by human to animal infection and employees must be screened for the disease, infected animals may serve as reservoirs and, associated to environmental contamination, may frustrate effective disinfection. Therefore, specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* in these two tapirs was very important for zoonoses and public health since they may be source of infection to other animals, employees and visitors while sharing common areas, particularly immuno-compromised individuals such as children and aged adults.

Financial support: Fundação Araucária (funding), UFPR-TN and Capes (fellowships).

1. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE HUMANA E ANIMAL

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE HUMANA E ANIMAL

Luiz Felipe M. Cavazzani ¹

Alexander W. Biondo ^{2,3*}

Ivan Roque de Barros Filho ²

Renato Silva de Sousa ⁴

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de abrangência mundial que afeta seres humanos e diversas espécies de animais. A principal espécie de microorganismo infectante dos bovinos é *Mycobacterium bovis*, que pelo número de casos, é uma manifestação endêmica no Brasil e causa prejuízos econômicos porque interfere na redução da produtividade do rebanho e perdas de carcaças no frigorífico. Ainda, por se tratar de uma zoonose, *M. bovis* pode infectar seres humanos, causando uma doença clinicamente e patologicamente indistinguível da infecção por *M. tuberculosis*. Apesar da falta de informações e da importância da tuberculose bovina para a saúde da população, o aumento do número de pacientes imunossuprimidos no país, principalmente pelo vírus da imunodeficiência humana, causa preocupação em relação às doenças causadas por espécies atípicas.

1 Biólogo, Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico - Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, 81530-130 Brasil. Email: lfmcavazzani@ufpr.br

2 Professor Adjunto, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, Curitiba, Curitiba, Paraná, 80.035-050, Brasil. Email: ivanbarf@ufpr.br

3,* Professor Visitante, Departamento de Patobiologia, Universidade de Illinois, 1008 West Hazelwood Drive, Urbana, Illinois, Urbana, 61802, Estados Unidos. E-mail: abiondo@illinois.edu.

4 Professor Assistente, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, Curitiba, Curitiba, Paraná, 80.035-050, Brasil. Email: renatosousa@ufpr.br

A espécie *M. bovis* é transmitida principalmente por via aerógena entre bovinos e pelo consumo de leite e derivados crus pelas pessoas. A imunidade do hospedeiro contra os bacilos da tuberculose envolve uma variedade de eventos celulares, podendo resultar em apresentações clínicas e patologia diferenciada, variando desde infecções autolimitantes até doença sistêmica grave. O diagnóstico em bovinos é realizado principalmente por tuberculinização, entretanto é importante identificar por ensaios laboratoriais a espécie causadora da doença. Embora os programas de controle e erradicação da doença tenham sido implantados apenas na última década no país, o controle da tuberculose é fundamental para saúde pública, saúde animal e produção animal.

Palavras-chave: bovinos, *Mycobacterium bovis*, tuberculose, zoonose, tuberculinização

LABORATORY DIAGNOSTICS OF HUMAN TUBERCULOSIS AND ANIMAL TUBERCULOSIS

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease of global scope that affects humans and several other animal species. The main species infecting cattle is *Mycobacterium bovis*, which is endemic in Brazil and causes economic losses by reducing the productivity of livestock and loss of carcasses in the slaughterhouse. Still, this is a zoonosis, *M. bovis* can infect humans, causing a disease clinically and pathologically indistinguishable from infection by *M. tuberculosis*. Despite the lack of information of relevance of bovine tuberculosis to humans, increasing the number of immunocompromised patients in the country, especially by the human immunodeficiency virus, concern about diseases caused by atypical species. *M. bovis* is transmitted mainly through aerogenes among cattle and the consumption of raw milk and dairy products for people. The immunity of the host against the bacilli of tuberculosis involves a variety of cellular events and may result in different clinical presentations and pathology, ranging from infections to self severe systemic disease. The diagnosis is performed mainly in cattle by tuberculin test (skin test), however it is important to perform laboratory identification of the species causing the disease. Although the control and eradication programs have been

implemented only in the last decade in the country, the control of tuberculosis is essential to public health, animal health and animal production.

Key words: cattle, *Mycobacterium bovis*, tuberculosis, zoonosis, skin test

DIAGNÓSTICOS LABORATORIALES DE LA TUBERCULOSIS HUMANA Y ANIMAL

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de alcance mundial que afecta a los seres humanos y otras especies animales. La principal especie que infectan el ganado es *Mycobacterium bovis*, que es endémica en Brasil y causa daños económicos por la reducción de la productividad del ganado y las pérdidas de canales en el matadero. Por que es una zoonosis, *M. bovis* puede infectar a los humanos, causando una enfermedad clínica y patológicamente indistinguible de la infección por *M. tuberculosis*. La falta de información de la tuberculosis bovina como zoonosis, el aumento del número de pacientes inmunocomprometidos en el país, especialmente por el virus de inmunodeficiencia humana, causa preocupación por las enfermedades causadas por especies atípicas. *M. bovis* se transmite principalmente através de aerogenes entre el ganado y el consumo de leche cruda y productos lácteos para las personas. La inmunidad del huésped contra los bacilos de la tuberculosis consiste en una variedad de eventos celulares y puede dar lugar a diferentes presentaciones clínicas de la patología, que van desde infecciones autolimitantes a la grave enfermedad sistémica. El diagnóstico, en el ganado, se realiza principalmente por la prueba de la tuberculina (la prueba en la piel), sin embargo, es importante llevar a cabo la identificación laboratorial de la especie causante de la enfermedad. Aunque el control y los programas de erradicación se han aplicado sólo en la última década en el país, el control de la tuberculosis es fundamental para la salud pública, sanidad animal y la producción animal.

Palabras-clave: Ganado, *Mycobacterium bovis*, tuberculosis, zoonosis, prueba cutánea

Introdução

A Tuberculose é uma enfermidade que há muito acomete tanto a população humana quanto animal. Desde o século XIX a Tuberculose é tida como uma das doenças que mais ocasiona mortes em todo o Mundo.

Mesmo com a descoberta de tratamentos eficazes para combater esta doença o número de aparecimento de novos casos ainda não tem um controle ideal. Este fato ocorre possivelmente pela tuberculose ser considerada uma doença “social”. Este termo caracteriza uma maior incidência de tuberculose junto às classes populares, em virtude das precárias condições de vida. Outro fator preponderante na prevalência da Tuberculose na população Humana e Animal é a existência de reservatórios naturais de micobactérias.

A identificação do bacilo de Koch, em 1882, como o agente etiológico da Tuberculose foi um marco fundamental para o conhecimento da doença. Significou também uma importante contribuição para o fortalecimento da teoria da transmissibilidade das doenças, que vinha se desenvolvendo com as pesquisas de Pasteur e outros cientistas.

Com base na identificação deste bacilo, buscou-se apresentar neste artigo de revisão, os métodos diagnósticos de Tuberculose Humana e Animal utilizados na atualidade, fortalecendo assim as iniciativas de controle e reconhecimento da Tuberculose e de seus reservatórios naturais.

Revisão de Literatura

1.1 Tuberculose Humana

A Tuberculose humana é a segunda causa de morte, por doenças infecto-contagiosas no mundo, ficando atrás apenas das mortes causadas por HIV/AIDS (1). Várias pessoas conhecidas mundialmente, tais como Frédéric Chopin, Paganini, São Francisco de Assis, Noel Rosa, entre muitas outras foram vítimas desta enfermidade (2). O Brasil é o 15º país no mundo em casos de tuberculose e um dos 22 países responsáveis por 80% de novos casos de tuberculose no mundo (3).

Esta doença é causada por microorganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (*Actinomycetales*, *Mycobacteriaceae*) apresentando aproximadamente 100 espécies descritas (4). As micobactérias causadoras de tuberculose em mamíferos fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* que inclui as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* (bacilo Calmette-Guérin BCG), *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium canettii* (5).

As micobactérias são bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) (6). Estes bacilos foram descobertos por Robert Koch, em 1882. Isto foi um marco fundamental para o conhecimento da doença. Significou também uma importante contribuição para o fortalecimento da teoria da transmissibilidade das doenças, que vinha se desenvolvendo com as pesquisas de Pasteur e outros cientistas, além de reforçar a concepção biológica das doenças. Essa descoberta impulsionou novas tentativas em direção ao controle e tratamento específico da tuberculose, não apresentando, porém, neste contexto, avanços terapêuticos significativos (7).

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria aeróbica que comumente afeta os pulmões e seu progresso é controlado pela integridade do sistema imune do hospedeiro, onde estas bactérias podem ser eliminadas ou mantidas em condição de latência. Com a falha na integridade do sistema imune do hospedeiro a doença então se desenvolve (2).

1.2 Tuberculose Bovina

A infecção pelo *Mycobacterium bovis* causa a tuberculose bovina. Até 1970 o bacilo tuberculoso bovino foi considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. KARLSON & LESSEL (8) propuseram sua classificação como espécie individual denominada *Mycobacterium bovis* (9).

A tuberculose bovina é uma doença granulomatosa crônica, que geralmente afeta os linfonôdos e o tecido pulmonar dos bovinos. O *M. bovis* tem uma identidade de genoma 99,95% compartilhada com o *M. tuberculosis* que é o agente da tuberculose humana (10). Já passados mais de cem anos da sua descoberta, esta enfermidade continua tendo grandes impactos devido, entre outros motivos, a grande incidência nos países em desenvolvimento, sendo estes reservatórios do *M. bovis* (11).

O *M. bovis* é uma bactéria intracelular que infecta os macrófagos e outras células da linhagem monocítica (12). Esta micobactéria afeta uma ampla variedade de hospedeiros, causando assim prejuízos econômicos para a pecuária, além de infecções atípicas em seres humanos, sendo então chamada de tuberculose zoonótica, com sistema imune comprometido (11).

Os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998. Um levantamento realizado em 1999, no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo foram detectadas 5% das propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu para 15% do universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção. Estima-se que os animais infectados perdem de 10% a 25% da sua eficiência produtiva (13).

O diagnóstico *post-mortem* da tuberculose causada por *M. bovis* baseia-se geralmente em exames histológicos e bacteriológicos realizados a partir de amostras teciduais. (14).

1.3 Contaminações Interespecíficas

Como zoonose, suspeita-se que a infecção pelo *M. bovis* seja responsável por mais de 4 mil dentre 100 mil casos de tuberculose humana descritos anualmente no Brasil (15). Os seres humanos parecem ser tão susceptíveis ao *M. bovis* quanto ao *M. tuberculosis*, sendo contaminados pela ingestão, inalação, ou menos freqüente, pelo contato com mucosas ou feridas com micobactérias infectantes (12). A grande incidência de pessoas imunossuprimidas atualmente seja por doenças ou por tratamentos como quimioterapia e transplantes de órgãos, pode ser um dos fatores pela ocorrência desta contaminação interespecífica (16). Infecções por *M. bovis* em seres humanos podem ser adquiridas mais comumente pelo consumo de leite e derivados crus (17), levando ao desenvolvimento de doença extrapulmonar (18).

Esta doença exerce grande importância na saúde pública sendo necessário um rígido controle por parte das agências sanitárias para o seu melhor entendimento e controle. No Estado do Paraná existem normas de controle e erradicação da doença

desenvolvidas pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SEAB). Apesar de diversos estudos sobre vacinação e tratamento da tuberculose bovina, até o presente momento, os resultados obtidos não justificam a adoção dessas medidas como forma de controle da enfermidade (19; 20). Portanto é necessário um acompanhamento por meio de diagnósticos mais conclusivos a fim de se ter um rastreamento mais específico do agente causador desta enfermidade.

1.4 Métodos Diagnósticos

O diagnóstico preciso da infecção pelo *Mycobacterium bovis* de animais vivos é notoriamente problemático. A patogênese desta doença pode variar dentro da mesma espécie bem como entre espécies distintas, resultando em diferentes vias de excreção e transmissão padrões (21).

Nestas circunstâncias, é necessário desenvolver sistemas de diagnóstico que são diretamente aplicáveis de amostras biológicas e permitir um elevado nível de realização e bons níveis de sensibilidade e especificidade, permitindo um diagnóstico rápido, no laboratório, utilizando as amostras colhidas no matadouro (22).

Pode-se afirmar que existem métodos diagnósticos adequados para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, entretanto, não existe um método diagnóstico da tuberculose bovina que tenha uma eficácia absoluta. A prova tuberculínica, a vigilância epidemiológica em matadouros, os controles sanitários, o diagnóstico de laboratório, são todos elementos básicos que devem ser empregados com critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica (22).

Independentemente dos métodos de diagnóstico utilizados, é fundamental que os animais positivos sejam abatidos, evitando-se, assim, a disseminação da tuberculose (23).

1.4.1 Diagnóstico Clínico

Possui valor relativo, porque o animal pode estar infectado, com um foco localizado e apresentar-se aparentemente sadio. Períodos prolongados de incubação, chegando até vários anos, em algumas espécies, tais como búfalos Africano (*Syncerus*

caffer), indicam que animais aparentemente saudáveis podem transportar e transmitir micobactérias patogênicas (21). O diagnóstico clínico torna-se importante para os animais com tuberculose avançada, para os quais o teste tuberculínico perde seu valor pela possibilidade do fenômeno da anergia (Desaparecimento da capacidade de o organismo reagir a uma substância ou a um agente patogênico relativamente aos quais estava anteriormente sensibilizado) à tuberculina. Os sinais clínicos mais frequentes são a caquexia progressiva e a tosse seca, curta e repetitiva. Podem ser reconhecidos também sinais de broncopneumonia com tosse úmida (com presença de escarro) seguida de dispnéia e taquipnéia. Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória. Pode ocorrer linfadenomegalia localizada ou generalizada (23;24).

1.4.2 Tuberculinização

A tuberculinização é um teste imunológico feito em campo. Este método é utilizado para o diagnóstico da doença por ser seguro e detectar a infecção à partir da terceira semana do seu início sem a necessidade de encaminhar as amostras para laboratório (25). Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: a PPD bovina, procedente do *M. bovis*; e a PPD aviária proveniente do *M. avium* (26).

A metodologia do teste consiste no **Teste Cervical Simples (TCS)** observando-se as seguintes condições e critérios:

I - deve ser realizado com inoculação intradérmica de tuberculina PPD bovina, na dosagem de 0,1 ml, na região cervical ou na região escapular de bovinos, devendo a inoculação ser efetuada de um mesmo lado de todos os animais do estabelecimento de criação.

II - o local da inoculação será demarcado por tricotomia e a espessura da dobra da pele medida com cutímetro antes da inoculação;

III - após 72 horas, mais ou menos 6 horas, da inoculação, será realizada nova medida da dobra da pele, no local de inoculação da tuberculina PPD bovina (Proteína Purificada Derivada);

IV - o aumento da espessura da dobra da pele (ΔDB) será calculado subtraindo-se da medida da dobra da pele 72 horas, mais ou menos 6 horas, após a inoculação à medida da dobra da pele no dia da inoculação da tuberculina PPD bovina;

V - os resultados em bovinos serão interpretados de acordo com a Tabela 1 (19).

Tabela 1 – Interpretação do teste cervical simples em bovinos (27).

ΔB (mm)	Características da reação			Interpretação
	Sensibilidade	Consistência	Outras alterações	
0 a 1,9	-	-	-	negativo
2,0 a 3,9	pouca dor	endurecida	delimitada	inconclusivo
2,0 a 3,9	muita dor	macia	exsudato, necrose	positivo
$\geq 4,0$	-	-	-	positivo

Apesar de ser seguro, o teste da tuberculina apresenta algumas limitações. Podem ocorrer reações inespecíficas pelo contato prévio com outras micobactérias ambientais resultando em falso positivo. Não reatividade levando a falsos negativos, decorrentes de infecções recentes, mau estado geral de saúde, imunossupressão pós parto entre outras (26) e reações cruzadas também com outros patógenos não relacionados como *Corynebacterium* e *Nocardia* spp. (28).

1.4.3 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado mediante o isolamento e a identificação do agente por métodos bacteriológicos. Amostras frescas podem ser fixadas em lâmina e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen para a pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), contudo, a sensibilidade do método é baixa, e um resultado positivo sugere fortemente tratar-se de micobactéria, mas não informa a espécie (29).

Essa mesma coloração pode ser empregada para colônias isoladas em meios de cultura. Muitas características, inclusive a propriedade tintorial, superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*, tornando difícil, em alguns casos, a diferenciação entre ambos. O diagnóstico bacteriológico por isolamento requer um longo período de incubação (30 a 90 dias), pois o *M. bovis* cresce lentamente em meios de cultura artificiais. Para permitir o isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* sp, recomenda-se a semeadura concomitante nos meios de cultura Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie (30).

Segundo Grange et al. (18), com base nas características morfológicas da cultura e pelo perfil bioquímico é possível diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. O *M. bovis* tem seu crescimento dificultado em meios que contenham glicerol, sendo essa uma característica importante para diferenciação entre os dois microrganismos. Algumas cepas de *M. bovis* crescem exclusivamente em meios de cultura que possuem suprimento de piruvato ao invés de glicerol e outras não possuem tanta especificidade por este suprimento. Devido este fato a necessidade do cultivo do material biológico nestes dois meios, sendo o Löwenstein-Jensen apresentando um suprimento de glicerol e Stonebrink-Lesslie um suprimento de piruvato.

1.4.4 Diagnóstico *post mortem*

O diagnóstico anatomo-patológico, ou *post mortem*, da tuberculose bovina ocorre durante a necropsia ou na análise pela inspeção sanitária de carcaças em frigoríficos-matadouros. É um diagnóstico que apresenta certa dificuldade, pois, muitos processos inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para tuberculose, ou seja, lesões nodulares com 1 mm a 2 cm de diâmetro, confluentes ou não, de cor amarelada, envolvida por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto caseoso ou purulento no seu interior (31).

Estas lesões estão presentes em infecções causadas por outros microorganismos, tais quais, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, por fungos, na infestação por larvas de parasitos e até por alguns processos neoplásicos (31;32).

Cerca de 70 a 90% destas lesões presuntivas, encontradas em abatedouros-frigoríficos, para tuberculose bovina ocorrem nos linfonôdos da cabeça (Sublingual, carotídeo e retrofaríngeo), e da cavidade torácica (mesentérico, mediastínico ou brônquico e hepático). Do total de lesões em carcaças abatidas com lesão presuntiva para tuberculose bovina, em regiões com alta prevalência da doença, como países em desenvolvimento com uma grande quantidade de rebanho bovino como o Brasil e a Índia, 47% são de fato tuberculosas (31;32; 20).

1.4.5 Diagnóstico Histopatológico

O diagnóstico histopatológico consiste na análise de lesões presentes em materiais colhidos geralmente *post mortem* (33).

A metodologia clássica consiste na fixação das amostras de tecido com lesões características em formol, geralmente a 10%. Após este processo de fixação as amostras são inseridas em blocos de parafina de acordo com metodologias padrão. As amostras que possuem lesões fortemente calcificadas passam por um processo de descalcificação para facilitar no preparo dos cortes histológicos. São efetuados cortes com cerca de 2 micrômetros, para o preparo das lâminas histológicas que serão coradas. O método clássico de coloração de micobactérias é o Ziehl-Nielsen ou método de coloração a quente e sua variante Fite Faraco (34). Nesta metodologia as lâminas histopatológicas são coradas com o corante Fucsina e Azul de Metileno (29).

Nesta técnica os bacilos, forma das micobactérias, são visualizados como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos corados em vermelho com o fundo azul (35).

1.4.6 Diagnóstico Molecular

Métodos moleculares de diagnósticos possuem grande importância para um estudo epidemiológico da tuberculose, tanto bovina como humana. Técnicas de tipagem molecular, que detectam polimorfismos na micobactéria tem sido usadas em estudos epidemiológicos de transmissão da tuberculose (36).

A identificação molecular de espécies do gênero *Mycobacterium* possui duas principais vantagens em comparação com as técnicas fenotípicas de identificação (tais como os métodos de diagnósticos aqui citados): ser uma ferramenta de identificação rápida e uma exata identificação diferencial de espécies do gênero *Mycobacterium* (37).

A maioria das abordagens moleculares utilizadas é baseada na conservação da sequência de DNA que codifica a subunidade menor (16S) do RNA ribossomal (rRNA). Existem ainda estudos de polimorfismos de *locus* de repetições diretas (DR) (técnica de *spoligotyping*), análises de números variáveis de repetições em *tanden* (MIRU-VNTR) e análises das regiões de deleção do genoma da micobactéria pelo método de reação em cadeia da polimerase (36; 5; 38; 39). Técnicas de sequenciamento do gene codificador da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) das bactérias também são largamente utilizadas como método diagnóstico molecular de micobactérias (40).

Para a análise molecular de amostras a partir de lesões granulomatosas contaminadas pelo *M. bovis* é necessário que a escolha do método de extração de DNA seja feita com maior cuidado, pois se trata de uma bactéria intracelular. Portanto é necessário usar técnicas de extração como a descrita por BOOM et al.(41), devido à diminuição da presença de fatores de inibição de amplificação (como enzimas de degradação de DNA presentes no tecido dos animais abatidos) proporcionada por esta técnica (30).

1.4.7 Novas Metodologias de Diagnóstico

Ainda não existe uma vacina eficaz contra a Tuberculose tanto humana quanto bovina e o diagnóstico ainda depende da baciloscopia, que tem apenas 60% a 70% de sensibilidade. O longo tempo necessário de incubação da cultura para micobactéria e os esquemas atuais de tratamento, tanto da doença quanto da infecção latente, são insatisfatórios por serem prolongados e apresentarem efeitos adversos em diferentes populações que dificultam o seu manuseio (42).

Novas metodologias de diagnóstico possibilitarão um avanço no número de diagnósticos, possibilitando assim um melhor tratamento e acompanhamento de pessoas infectadas. Com isso espera-se que o diagnóstico chegue a 70% das pessoas infectadas e o tratamento alcance cerca de 85% destas pessoas (43). Os avanços estão se baseando na melhoria dos métodos antigos e na apresentação de novos métodos.

Os avanços na microscopia buscam na utilização da microscopia de fluorescência, com os corantes auramina–rodamina, melhorar a sensibilidade na detecção das micobactérias (44).

Nos testes de cultivo bacteriano, teste padrão para o diagnóstico, os esforços buscam acelerar o tempo de resultado. Em meio de cultivo sólido, padrão utilizado na maioria dos laboratórios de diagnóstico de tuberculose, este teste tem um tempo de resposta de 4 a 6 semanas. Nos meios líquidos o tempo desta resposta alcança de 1 a 3 semanas. Além de diminuir o tempo de resposta, os novos métodos de cultivo em meio líquido podem ser automatizados possibilitando um maior número de diagnóstico em menor tempo (45).

Outro tipo de diagnóstico, que os avanços são demonstrados pela automatização para um melhor resultado, são os baseados em conceitos de Biologia Molecular. São

muitos os kits comerciais e cada um utiliza um método diferente para amplificar regiões específicas de DNA das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Entre eles podemos citar o GenProbe Amplified M. tuberculosis Direct test (AMTD)®, o Roche Amplicor MTB test®, o Cobas Amplicor test®, Abbott LCx test® e o BD-ProbeTec (SDA) test® (46).

Porém muitos pesquisadores vêm nos métodos de diagnósticos imunológicos como grande possibilidade de suprir as necessidades dos métodos atuais (47; 48) . Os testes imunológicos baseiam-se no conceito de que células T de indivíduos previamente sensibilizados por antígenos do *M. tuberculosis* liberam IFN- γ quando reestimuladas por antígenos específicos. Este teste, ao contrário do teste cutâneo com o PPD, é realizado *ex vivo*, ou seja, através da cultura de uma amostra de células do sangue periférico do paciente, por 24 h, em presença de antígenos do *M. tuberculosis* (48). Consequentemente, as células sensibilizadas e específicas produzem e secretam IFN- γ no sobrenadante da cultura, que pode ser posteriormente detectado por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA) (48).

Estes testes parecem oferecer a possibilidade de melhorar a detecção e são adequados para áreas com recursos limitados. As principais vantagens destes testes diagnósticos com base imunológica são a velocidade (os resultados podem estar disponíveis dentro de horas) e simplicidade (49), em comparação com os outros testes aqui citados.

1.5 Considerações finais

Apesar de a tuberculose ser uma doença antiga, ainda causa muitos danos e transtornos para a saúde pública e animal. Com esta revisão buscamos demonstrar quais os avanços, no que diz respeito ao diagnóstico, que estão sendo alcançados com pesquisas nas mais variadas áreas das ciências da saúde e biológica.

Ainda que possua tratamento, a erradicação da tuberculose esta mais relacionada a ações que visem um diagnóstico mais rápido e eficaz, possibilitando assim traçar ações mais efetivas de combate.

1.6 Referências

1. FRIEDEN, T. R.; STERLING, T. R.; MUNSIFF, S. S.; WATT, C. J.; DYE, C. Tuberculosis. *Lancet*, London, 2003; 362: 887-899.
2. DUCATI, R. G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2006; 101(7): 697-714.
3. WHO. World Health Organization. WHO 2007 Report. Global Tuberculosis Control. [cited 2009 Jan. 13] Available from: <http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/bra.pdf>.
4. MATTHIAS, D. Infecções por Micobactérias. In: BEER, J. Doenças Infecciosas em Animais Domésticos. 1. ed. São Paulo: Rocca, 1988. p. 261-289.
5. HUARD, R. C.; FABRE, M.; HAAS, P.; LAZZARINI, L. C. O.; SOOLINGEN, D.; COUSINS, D. et al. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (12): 4271-4287.
6. DORRONSORO, I.; TORROBA L. Microbiology of tuberculosis. In: *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*. 2007. v. 27, supl. 2, p. 67-84.
7. TAYLOR, G. M.; STEWART, G. R.; COOKE, M.; CHAPLIN, S.; LADVA, S.; KIRKUP, J. et al. Koch's Bacillus – a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology*. 2003; 149: 3213-3220.
8. KARLSON, A.G.; LESSEL, E.F. *Mycobacterium bovis* nom nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1970; 20: 273-282.
9. FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da Tuberculose Bovina. *Higiene Alimentar*, São Paulo, 1997. [cited 2009 Jun. 15] Available in <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0008.htm>>.
10. GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B. et al. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 2001; 81(1/2): 157-163.
11. O'REILLY, L.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1995; 76 (1): 1-46.

12. RUA-DOMENECH, R. DE LA; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 2006; 81: 190-210.
13. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Departamento Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) [on line].[cited 2007 set. 12] Available from <<http://www.agricultura.gov.br>>.
14. FUVERKI, R. B. N.; MURAKAMI, P. S.; BIONDO, A. W.; BARROS FILHO, I. R. PCR use for detection and identification of mycobacterias from bovine clinical samples. *Archives of Veterinary Science.* 2008; 13 (1): 73-77.
15. LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; 98 (3): 319-323,
16. MATTOS, I. G.; RIBEIRO, M. O.; NETTO, I. C. O.; AZEVEDO, P. A. Tuberculosis: A study of 111 cases in na área of high prevalence in the extreme south of Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2006; 10 (3): 194-198.
17. ACHA, P.; SZYFRES, B. Zoonoses and Communicable Diseases Commom to Man and Animals. v. 1. Bacterioses and Mycoses. 3 ed. Washington D. C.: Pan American Health Organization, 2003, 384 p.
18. GRANGE, J.M., YATES, M.D., KANTOR, I.N. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. World Health Organization. 1996; 2.ed. 23p.
19. BRASIL. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do estado do Paraná. Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) [on line]. [cited 2007 set. 12]. Available from: <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/regulamento_pecebt.pdf>
20. MENZIES, F.D. e NEILL, D. Review – Cattle-to-cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *Vet. J.* 2000; 160: 92-106.

21. DREWE, J. A.; DEAN, G. S.; MICHEL, A. L.; PEARCE, G. P. Accuracy of three diagnostic tests for determining *Mycobacterium bovis* infection status in live-sampled wild meerkats (*Suricata suricatta*). J. Vet. Diagn. Invest. 2009; 21: 31-39.
22. PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; HERMOSO DE MENDOZA, J. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 2008; 127: 315-324.
23. FUNDEPEC, PR. Tuberculose. Fundo de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Paraná. Available from <http://www.fundepecpr.org.br/?pag=tuberculose_diagnostico> [cited 2009 Fev. 10].
24. USDA-APHIS. Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) Surveillance Standards 11/2001. United States Department of Agriculture -Animal and Plant Health Inspection Service. Available from <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/tuberculosis/downloads/bovine-tb.pdf> [cited 2009, Fev. 12].
25. EMBRAPA. Folhetim explicativo sobre Tuberculose bovina. Available from <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2006/f-07.pdf>[cited 2009, Jan. 18].
26. MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. Vet. Microbio. 1994; 40: 111-124.
27. SEAB, PR. Regulamento técnico do programa estadual de controle e erradicação da Brucelose e da Tuberculose animal. Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Paraná. Available from <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/regulamento_pecibt.pdf> [cited 2008, Dez. 20].
28. ROMERO, R.E.; GARZÓN, D.L.; MEJÍA, G.A.; MONROY, W.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. Can J Vet Res. 1999; 63: 101-106.
29. VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA, E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. J. Vet. Diagn. Invest. 2008; 20: 164-169.

30. RIBEIRO, D. C. Comparação de Protocolos de Extração de DNA para Detecção de *Mycobacterium bovis* Através da PCR em Homogeneizados de Órgãos Bovinos. [dissertação] São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
31. SALAZAR, F. H. P. Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil.[dissertação] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2005.
32. CORNER, L. A. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 1994; 40: 53-63.
33. WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y.; BELLI, P. Comparison of Three Diagnostic Detection Methods for Tuberculosis in French Cattle. J. Vet. Med. 2006; 53 (B): 321–325.
34. CARSON, F.L., HLADIK, C. Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3.ed. American Society for Clinical Pathology (ed). 2008.
35. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3. ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF, 2005.
36. BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M. M.; MADEIRA, S. G.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTI, O. A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with high incidence of tuberculosis. Microbes Infect. 2005; 7 (13): 1338-1344 2005.
37. MOHAMED, A. M.; EL-ELLA, G. A. A.; NASR, E. A. Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. J. Vet. Diagn. Invest., 2009; 21: 48–52.
38. KWARA, A.; SCHIRO, R.; COWAN, L. S.; HYSLOP, N. E.; HARRISON, S. R.; KISSINGER, P.; DIEM, L.; CRAWFORD, J. T. Evaluation of the Epidemiologic Utility of Secondary Typing Methods for Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. J. Clin. Microbiol. 2003; 46 (6): 683-2685.
39. KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; AGTERVELD, M. VAN; SOOLINGEN, D. VAN; KUIJPER, S. et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (4): 907-914.

40. ADÉkAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol. 2008; 17 (1): 37-45.
41. BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J. Clin Microbiol. 1990; 28 (3): 495-503.
42. KRITSKI, A. L.; VILLA, T. S.; TRAJMAN, A.; LAPA E SILVA, J. R.; MEDRONHO, R. A.; RUFFINO NETTO, A. Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. Revista Saúde Pública. 2007; 41 (1): 9-14.
43. WHO. World Health Organization. WHO. New technologies for tuberculosis control: a framework for their adoption, introduction and implementation. Geneva. WHO; 2007. Report No. WHO/HTM/STB/2007.402007. Available from <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/print.html>> [cited 2009 fev. 10].
44. STEINGART, K.; HENRY, M.; NG, V.; HOPEWELL, P.; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J. et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis. 2006; 6 (9): 570-581.
45. GARRIGO, M.; ARAGON, L. M.; ALCAIDE, F.; BORRELL, S.; CARDENOSA, E.; GALAN, J. J. et al. Multicenter Laboratory Evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* Detection System and the BACTEC MGIT 960 System in Comparison with the BACTEC 460TB System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 2007; 45 (6): 1766–1770.
46. LING, D. I.; FLORES, L. L.; RILEY, L. W.; PAI, M. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. PLoS One. 2008; 3 (2): e1536.
47. MUKHOPADHYAY, A.; GUAN, M.; CHEN, H. Y.; LU, Y.; LIM, T. K. Prospective study of a new serological test (ASSURE TB Rapid Test) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Inter. J. Tuber. Lung Dis. 2006; 10 (6): 620-624.

48. TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33 (3): 323-334.
49. STEINGART, K. R.; HENRY, M.; LAAL, S.; HOPEWELL, P. C.; RAMSAY, A.; MENZIES, D. et al. Commercial Serological Antibody Detection Tests for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Systematic Review. *PLoS One*. 2007; 4 (6): 1041-1060.

2. ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA TUBERCULOSE BOVINA EM 35 ANIMAIS DA REGIÃO CENTRO-ORIENTAL DO PARANÁ

ESTUDO COMPARATIVO DE 2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA TUBERCULOSE BOVINA EM 35 ANIMAIS DA REGIÃO CENTRO-ORIENTAL DO PARANÁ

Luiz Felipe M. Cavazzani ¹

Alexander W. Biondo ^{2,3 *}

Ivan Roque de Barros Filho ²

Thaísa Gomig ⁵

Renato Silva de Sousa ⁴

1 Biólogo, Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico - Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, 81530-130 Brasil. Email: lfmavazzani@ufpr.br

2 Professor Adjunto, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, Curitiba, Curitiba, Paraná, 80.035-050, Brasil. Email: ivanbarf@ufpr.br

3,* Professor Visitante, Departamento de Patobiologia, Universidade de Illinois, 1008 West Hazelwood Drive, Urbana, Illinois, Urbana, 61802, Estados Unidos. E-mail: abiondo@illinois.edu.

4 Professor Assistente, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, Curitiba, Curitiba, Paraná, 80.035-050, Brasil. Email: renatosousa@ufpr.br

5 Aluno de graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, Curitiba, Curitiba, Paraná, 80.035-050, Brasil. Email: thagomig@yahoo.com.br

RESUMO

A tuberculose bovina é uma enfermidade infecciosa de ocorrência mundial. O teste intradérmico é o método padrão para seu diagnóstico, embora possua baixa sensibilidade e especificidade. O presente estudo teve como objetivo comparar o diagnóstico da tuberculose bovina pelo teste intradérmico e coloração de Fite-Faraco (Ziehl-Nielsen modificado). Um total de 35 bovinos reagentes, ou indeterminados e negativos à prova de tuberculinização foram utilizados, tendo amostras de tecidos colhidas no momento do abate. Do total de bovinos examinados, 85,71% (30/35) apresentaram lesão macroscópica sugestiva de tuberculose. Na avaliação microscópica (Citologia) 60,00% (21/35) apresentaram características de algum tipo de lesão. Na avaliação histopatológica, 40,00% (14/35) dos animais apresentaram lesões granulomatosas características de tuberculose, onde foram visualizados Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). Em relação à prova de Tuberculina 48,57% (17/35) dos animais foram diagnosticados positivos para Tuberculose, 22,86% (8/35) apresentaram resultado inconclusivo e 28,57% (10/35) apresentaram resultado negativo. Com a interposição destes dados obtemos que dos 17 animais positivos para prova da tuberculina 41,17% (7/17) animais não apresentaram lesão característica de tuberculose com a presença de BAAR, 88,23% (15/17) tinham lesão macroscópica sugestiva de tuberculose e 52,94% (9/17) apresentavam algum tipo de lesão microscópica. O exame macroscópico detalhado associado ao exame histopatológico, devido à sua alta especificidade, são recomendados como ferramentas complementares e podem ser utilizados para confirmar os casos duvidosos no abatedouro.

Palavras-chave: histopatologia, *Mycobacterium bovis*, tuberculose, zoonose, tuberculinização

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an infectious disease of worldwide occurrence. The intradermal test is the standard method for diagnosis, but has low sensitivity and specificity. This study aimed to compare the diagnosis of bovine tuberculosis by the intradermal test and Fite-Faraco stain (modified Ziehl-Nielsen). A total of 35 cattle reagents, and negative or indeterminate for skin test were used, and samples of tissues taken at slaughter. Of the total cattle examined, 85.71% (30/35) showed gross lesions suggestive of tuberculosis. On microscopic evaluation (cytology) 60.00% (21/35) showed characteristics of some type of injury. In histopathological evaluation, 40.00% (14/35) of animals showed granulomatous lesions characteristic of tuberculosis, which were viewed resistant alcohol-acid bacillus (RAAB). In relation to the skin test 48.57% (17/35) of animals were diagnosed positive for tuberculosis, 22.86% (8 / 35) had inconclusive results and 28,57% (10/35) showed negative results. The comparison of these data to obtain the 17 animals positive for the tuberculin test, 41.17% (7/17) animals showed no lesions characteristic of tuberculosis in the presence of (RAAB), 88.23% (15/17) had gross lesions suggestive of tuberculosis and 52.94% (9 / 17) had some kind of microscopic damage. The detailed microscopic examination associated with the histopathological examination, due to its high specificity, are recommended as complementary tools and can be used to confirm doubtful cases in the slaughterhouse.

Keywords: histopathology, *Mycobacterium bovis*, tuberculosis, zoonoses, tuberculinização

Introdução

A tuberculose é uma das mais antigas doenças infecciosas conhecidas. No bovino, é uma enfermidade infecciosa determinada pelo agente *Mycobacterium bovis*, de ocorrência mundial, que determina prejuízos na casa dos 250 milhões de dólares norte americanos só nos países do continente americano à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal (FRÁGAS, 2008).

Todas as espécies de mamíferos, incluindo a humana, e grupos etários são susceptíveis ao *M. bovis*, sendo os bovinos, caprinos e suínos os mais afetados, ao passo que os ovinos e eqüinos mostram uma alta resistência natural. Animais silvestres tais como o texugo na Inglaterra e Irlanda, o gambá na Nova Zelândia, o veado, o cervo, o alce e o bisão na América do Norte e os búfalos na África do Sul e na Austrália podem atuar como hospedeiros silvestres do *M. bovis* (RADOSTITS et al., 2002). Alguns hospedeiros silvestres encontrados no Brasil são a Anta Brasileira (*Tapirus terrestris*) e Quatis (*Nasua nasua*) (MURAKAMI, 2007).

O *M. bovis*, assim como as outras micobactérias causadoras de tuberculose em mamíferos, fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* que inclui as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* (bacilo Calmette-Guérin BCG), *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium canettii* (HUARD et al., 2006).

No Brasil, estimava-se em 200 mil bovinos infectados entre uma população total, naquela época, de aproximadamente 170 milhões (LEITE et al., 2003). Dados de notificações oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3 % de animais reagentes à tuberculina no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006).

A tuberculose bovina é importante não apenas devido aos prejuízos econômicos, mas também pelo fato de ser uma fonte de infecção para seres humanos (ACHA e SZYFRES, 2003). A tuberculose como zoonose é preocupante, principalmente nos países em desenvolvimento, sendo necessárias melhorias nos aspectos de saúde pública veterinária em relação à infecção por *M. bovis*, especialmente nas populações em risco, como tratadores de rebanhos e trabalhadores da indústria de carnes. Um dos maiores problemas de saúde pública era a transmissão da tuberculose bovina ao homem por meio do leite de vacas infectadas, contudo, com o desenvolvimento da pasteurização

este problema foi minimizado (O'REILLY & DABORN, 1995; BRASIL, 2006). Como zoonose, suspeita-se que a infecção pelo patógeno seja responsável por mais de 4 mil de aproximadamente 100 mil casos de tuberculose humana descritos anualmente no Brasil (LEITE *et al.*, 2003).

O diagnóstico da tuberculose em bovinos se dá pela tuberculinização intradérmica como teste a campo, indicada pela resposta imune mediada por células. Tem representado um papel fundamental em programas de erradicação, como o primeiro teste diagnóstico (BRASIL, 2006). Apesar de ser seguro, o teste da tuberculina apresenta algumas limitações. Podem ocorrer reações inespecíficas pelo contato prévio com outras micobactérias ambientais resultando em falso positivo. Não reatividade levando a falsos negativos, decorrentes de infecções recentes, mau estado geral de saúde, imunossupressão pós parto entre outras (MONAGHAN *et al.*, 1994, NEILL *et al.*, 1994) e reações cruzadas também com outros patógenos não relacionados como *Corynebacterium* spp. e *Nocardia* spp. (ROMERO *et al.*, 1999).

A comprovação dos resultados do teste intradérmico pode ser feita por detecção de lesões típicas no exame *post mortem*. A análise histopatológica pode aumentar a confiança no diagnóstico. O exame cuidadoso de seis pares de linfonodos dos pulmões, da cabeça e do mesentério pode estabelecer o diagnóstico em 95% dos bovinos com lesões macroscópicas. No caso de infecções recentes não haverá lesões macroscópicas típicas visíveis (CORNER, 1994). Os linfonodos preconizados são os mandibulares, os parotídeos, os retrofaríngeos, o mediastinais, os traqueobrônquicos e os mesentéricos (BROWN e de ANDA, 1998). Whipple *et al.* (1996) em um estudo realizado com 30 bovinos positivos para tuberculose encontraram maiores alterações nos linfonodos traqueobrônquicos, mediastínicos e retrofaríngeos. Corner (1994) lembra que o isolamento de *M. bovis* é o caminho para o diagnóstico definitivo.

2.1 Histopatologia

A detecção da tuberculose em matadouro-frigoríficos depende da identificação de lesões macroscópicas, que muitas vezes não são observadas nas carcaças inspecionadas. No estudo de Whipple *et al.* (2006) foi isolado, dos 30 bovinos analisados, *M. bovis* de quatro animais que não apresentaram lesões macroscópicas na linha de inspeção. Ao correlacionarem os achados macroscópicos e histopatológicos

com o exame microbiológico encontraram uma correlação de 93,3% nos linfonodos traqueobrônquico, mediastínico e retrofaríngeo médio. As lesões macroscópicas descritas por Whipple et al. (1996) são circunscritas, amarelas esbranquiçadas, de vários tamanhos e números com envoltório cinzento. Na histopatologia descreve a presença de granuloma com necrose caseosa central e mineralização.

A histopatologia é uma forma de diagnóstico complementar ao exame *post mortem* de carcaças com lesões presuntivas de tuberculose. Este exame constitui-se em uma técnica direta de diagnóstico presuntivo pesquisando bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), ou indireta, detectando o granuloma, considerando a lesão característica desta doença (CASSIDY et al., 1999).

A metodologia clássica da análise histopatológica consiste na fixação das amostras de tecido com lesões características em formol, geralmente a 10%. Após este processo de fixação as amostras são inseridas em blocos de parafina de acordo com metodologias padrão. As amostras que possuem lesões fortemente calcificadas passam por um processo de descalcificação para facilitar no preparo dos cortes histológicos. São efetuados cortes com cerca de 2 micrômetros, para o preparo das lâminas histológicas que serão coradas. O método clássico de coloração de micobactérias é o Ziehl-Neelson ou método de coloração a quente e sua variante Ziehl-Nielsen Fite Faraco (CARSON & HLADIK, 2008). Nesta metodologia as lâminas histopatológicas são coradas com o corante Fucsina e Azul de Metileno (VARELLO et al., 2008). Esta técnica baseia-se nas propriedades tintoriais comuns as micobactérias, que quando tratados com reagentes álcool ácidos conseguem reter fucsina aquecida no interior de suas células (SALAZAR, 2005).

Neste trabalho buscamos analisar um plantel bovino, de uma região com grande movimentação pecuária do estado do Paraná, pelos métodos diagnósticos clássicos para a detecção de tuberculose bovina, prova tuberculínica e exame histopatológico.

2.2 Metodologias

2.2.1 Local de Coleta: As amostras foram coletadas no matadouro-frigorífico de bovinos Argus Ltda. (Serviço de Inspeção Federal nº 1710) de São José dos Pinhais, Paraná. O abate foi realizado no dia 30/04/2008, segundo normas da Secretaria Estadual da Agricultura e Abastecimento do estado do Paraná (SEAB-PR) para procedimentos de abate sanitário.

2.2.2 Amostras: Foram utilizados 35 bovinos (*Bos taurus*) da região da cidade de Palmeira, PR, 34 vacas da raça holandesa e 1 boi da raça Angus, todos analisados pelo teste de tuberculina bovina, encaminhados para o abatedouro Frigorífico.

2.2.3 Tuberculinização: O teste da tuberculina foi executado por um médico veterinário habilitado para realização dos exames sanitários de acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2007). Foram realizados 2 testes em cada animal com 60 dias de intervalo entre os testes.

2.2.4. Metodologia de colheita: As amostras utilizadas foram cortes de pulmão, linfonôdos da cabeça (sublingual, carotídeo e retrofaríngeo) e linfonôdos da cavidade torácica (mesentérico, mediastínico ou brônquico e hepático). No momento da coleta foi feito um exame macroscópico para a localização de granulomas sendo dada a preferência para a coleta de amostras que apresentam lesões granulomatosas. As amostras foram acondicionadas em recipientes com gelo para o seu transporte.

2.2.5. Histopatologia: As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária (Hospital Veterinário/Dep. de Medicina Veterinária/UFPR) e seccionadas de maneira que cada fragmento de lesão se constituísse de todas as camadas do granuloma, isto é, a transição entre a lesão e o tecido aparentemente normal, a cápsula e o tecido necrótico. Após este processo, cada secção foi acondicionada em recipientes plásticos de boca larga, contendo formol tamponado a 10% em uma quantidade na qual todo o material estivesse embebido na solução. Depois de fixadas, as amostras foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e cortados a 4 micrômetros, obtendo-se duas lâminas histológicas de cada bloco. As lâminas fixadas foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina, com o objetivo de se visualizar alterações histopatológicas e coloração de Fite-Faraco, com o objetivo de visualizar bacilos álcool-ácido resistentes (CARSON & HLADIK, 2008).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tuberculinização é um teste imunológico feito em campo. Este método é utilizado para o diagnóstico da doença por ser seguro e detectar a infecção a partir da

terceira semana do seu início sem a necessidade de encaminhar as amostras para laboratório (BRASIL, 2006). Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: a PPD bovina, procedente do *M. bovis*; e a PPD aviária proveniente do *M. avium* (MONAGHAN *et al.*, 1994). A seleção dos animais para participarem deste estudo foi feita através do teste da tuberculina. Como a propriedade apresentou alguns animais com resultado positivo para tuberculina, todos os animais que estavam próximos aos que apresentaram teste positivo foram encaminhados para o abate sanitário seguindo as normas do PNCBET (BRASIL, 2006). O resultado do teste da tuberculina é apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Teste cervical simples das amostras de 35 bovinos abatidos. Os resultados são expressos em milímetros (mm), onde A0-B0 é a medida inicial da dobra da pele e A72-B72 é a medida após 72 horas. A diferença de cada medida é expressa por #A ou #B e o resultado final obtido através da média final das 2 medidas #B - #A. O resultado do diagnóstico é obtido através da comparação com a tabela base de acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2007).

Amostra	Identificação	A0	A72	#A	B0	B72	#B	#B - #A	RESULTADO
1	57	6,7	10,8	4,1	6,3	15,1	8,8	4,7	POSITIVO
2	56	7	8,2	1,2	7,5	15	7,5	6,3	POSITIVO
3	53	9,2	12,5	3,3	7,2	16,1	8,9	5,6	POSITIVO
4	87	7,7	11,2	3,5	6,5	14	7,5	4	POSITIVO
5	63	8,5	9,6	1,1	7,4	11,2	3,8	2,7	INCONCLUSIVO
6	54	7	9,0	2	8,7	15,4	6,7	4,7	POSITIVO
7	73	7,4	8,0	0,6	6,7	8,3	1,6	1	NEGATIVO
8	77	6,5	8,1	1,6	6,6	10,5	3,9	2,3	INCONCLUSIVO
9	76	6,6	8,0	1,4	6,6	11	4,4	3	INCONCLUSIVO
10	86	6,7	7,7	1	5,7	9	3,3	2,3	INCONCLUSIVO
11	88	6,9	7,8	0,9	6,2	8,6	2,4	1,5	NEGATIVO
12	85	7,1	7,3	0,2	6,9	8,3	1,4	1,2	NEGATIVO
13	68	6,8	8,1	1,3	6,7	9,2	2,5	1,2	NEGATIVO
14	70	7,3	9,5	2,2	7,3	15,2	7,9	5,7	POSITIVO
15	75	7	7,3	0,3	6,7	11,6	4,9	4,6	POSITIVO
16	64	8,2	11,0	2,8	7,5	13,4	5,9	3,1	INCONCLUSIVO

17	42	6,5	9,1	2,6	6,2	13,5	7,3	4,7	POSITIVO
18	22	6,2	7,6	1,4	5,2	11	5,8	4,4	POSITIVO
19	59	7,1	9,5	2,4	8,0	18,1	10,1	7,7	POSITIVO
20	32	6,2	7,8	1,6	6,0	9,3	3,3	1,7	NEGATIVO
21	35	7,2	11,5	4,3	6	22,1	16,1	11,8	POSITIVO
22	89	6,4	8,2	1,8	6,1	10,1	4	2,2	INCONCLUSIVO
23	39	7,1	8,5	1,4	6,2	12,2	6	4,6	POSITIVO
24	40	8,8	12,2	3,4	6,8	12,4	5,6	2,2	INCONCLUSIVO
25	81	7,2	10,5	3,3	7,0	14,5	7,5	4,2	POSITIVO
26	27	8,4	10	1,6	6,1	15	8,9	7,3	POSITIVO
27	80	6,6	8,1	1,5	5,8	9,3	3,5	2	INCONCLUSIVO
28	97	8,4	10,0	1,6	8,4	10,3	1,9	0,3	NEGATIVO
29	93	6,4	8,4	2	5,8	8,7	2,9	0,9	NEGATIVO
30	99	7,4	7,5	0,1	6,6	7	0,4	0,3	NEGATIVO
31	Angus	9,9	11,0	1,1	9,5	25	15,5	14,4	POSITIVO
32	65	7,5	8,2	0,7	6,7	11,4	4,7	4	POSITIVO
33	104	5,7	8,0	2,3	5,1	7	1,9	-0,4	NEGATIVO
34	101	7,0	8,5	1,5	6,8	9,5	2,7	1,2	NEGATIVO
35	26	6	8,1	2,1	6,3	30	23,7	21,6	POSITIVO

A presença de resultados inconclusivos demonstra a limitação de utilização do teste da tuberculina. Este resultado pode ter ocorrido por várias razões, dentre as quais, não reatividade decorrente de infecções recentes e reações cruzadas com outros patógenos apresentando uma alta reatividade em momentos distintos (MONAGHAN *et al.*, 1994, ROMERO *et al.*, 1999).

No momento do abate a primeira análise feita nas amostras foi macroscópica enquanto estes animais eram abatidos e cortados conforme padrão do frigorífico. Nesta análise foram procurados processos inflamatórios granulomatosos com lesões nodulares com cerca de 2 cm de diâmetro, confluentes ou não, de cor amarelada, envolvida por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto caseoso ou purulento no seu interior (SALAZAR, 2005). Segundo Reis et al. (1996) os diagnósticos macroscópicos de linfadenites dados na linha de inspeção quando confrontados com os microscópicos representam 37,93% de erros de diagnósticos. Neste momento foi possível identificar

que, mesmo animais com resultado inconclusivo para a reação de tuberculina, apresentaram lesões semelhantes às de tuberculose como mostra a Figura 1.

Figura 1: Amostra de pulmão (animal n° 22) que apresentou resultado inconclusivo para reação de tuberculina porém com lesão sugestiva de tuberculose.



Os resultados das análises macroscópicas foram tabulados no Quadro 2, juntamente com as análises histopatológicas de lesão e de presença de micobactérias.

Quadro 2 – Descrição de presença de lesão nas amostras analisadas macroscopicamente, microscopicamente através da técnica de Hematoxilina-Eosina e presença de micobactérias pela técnica de Fite-Faraco.

Amostra	Tuberculina	MACRO (análise <i>post mortem</i>)	MICRO	
			Lesão	Fite Faraco
1	POSITIVO	B, D, F	D	D
2	POSITIVO	A (linf.)	A	A, F
3	POSITIVO	A*, B, D* e F*	C, E	C, E
4	POSITIVO	A*(Linf) e D	A, C1, E	A, E
5	INCONCLUSIVO	C1*, C2*, D	E	Não apresenta micobactérias
6	POSITIVO	C1, C2, D	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
7	NEGATIVO	A e D	A, C	C
8	INCONCLUSIVO	s/ lesão	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
9	INCONCLUSIVO	C e F	C	C
10	INCONCLUSIVO	A	A	Não apresenta micobactérias
11	NEGATIVO	A	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
12	NEGATIVO	C*, E, F	s/ lesão	Não apresenta micobactérias

13	NEGATIVO	A, C*, D*, E*, F*	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
14	POSITIVO	A*, C*, D, F*	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
15	POSITIVO	A*, D*	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
16	INCONCLUSIVO	A, C, D, E*, F*	A, C, E	A, C, E
17	POSITIVO	A*, C*, D, E*	E	E
18	POSITIVO	A*, B*, C*, F*	A	Não apresenta micobactérias
19	POSITIVO	A*, C*, D*, F*	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
20	NEGATIVO	A, C*, D, E	F	Não apresenta micobactérias
21	POSITIVO	A, D, E	C	Não apresenta micobactérias
22	INCONCLUSIVO	A, B, C, D	A, C, E	A, C, E
23	POSITIVO	A, B, C, D	B, E	B, E
24	INCONCLUSIVO	A, C, D, F	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
25	POSITIVO	s/ lesão	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
26	POSITIVO	A, D, E	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
27	INCONCLUSIVO	D	E	E
28	NEGATIVO	D e E	D	D
29	NEGATIVO	s/ lesão	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
30	NEGATIVO	D, E	C, E	Não apresenta micobactérias
31	POSITIVO	A	A	A
32	POSITIVO	s/ lesão	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
33	NEGATIVO	s/ lesão	s/ lesão	Não apresenta micobactérias
34	NEGATIVO	A e E	A, A1, A2	A, A1, A2
35	POSITIVO	D, E	E	Não apresenta micobactérias

A = Pulmão e/ou linfonodo mediastínico ou brônquico, B = Fígado e/ou linfonodo hepático, C = Linfonodo Mesentérico, D = Linfonodo retrofaríngeo, E = Linfonodo carotídeo, F = Linfonodo sublingual, 1-2 = Amostras de regiões diferentes do mesmo material, * Apenas alterações teciduais macroscópicas, sem lesão macroscópica compatível com tuberculose.

Com a sobreposição da tabela obtemos que do total de bovinos examinados, 85,71% (30/35) apresentaram lesão macroscópica sugestiva de tuberculose. Histologicamente, na coloração de hematoxilina e eosina, 60,00% (21/35) apresentaram lesões sugestivas de tuberculose. Na coloração de Fite-Faraco, 40,00% (14/35) dos

animais com lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose, resultaram positivo para Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). Em relação à prova de Tuberculina 48,57% (17/35) dos animais foram diagnosticados positivos para Tuberculose, 22,86% (8/35) apresentaram resultado inconclusivo e 28,57% (10/35) apresentaram resultado negativo. Com a interposição destes dados obtemos que dos 17 animais positivos para prova da tuberculina 41,17% (7/17) animais não apresentaram lesão característica de tuberculose com a presença de BAAR, 88,23% (15/17) tinham lesão macroscópica sugestiva de tuberculose e 52,94% (9/17) apresentavam algum tipo de lesão microscópica. Para os animais inconclusivos (8 animais) para o teste da tuberculina 50% (4/8) foram positivos para a presença de BAAR fortalecendo assim a necessidade de um teste complementar ao teste da tuberculina.

2.4 Conclusão

Podemos concluir neste trabalho que o Linfonodo Carotídeo apresenta uma maior incidência de BAAR, que resultados inconclusivos para o teste de tuberculina necessitam de uma análise mais adequada por outros métodos diagnósticos e devido ao baixo custo e a rapidez dos resultados recomenda-se o uso da histopatologia como método auxiliar em matadouros-frigoríficos.

2.5 Referências

ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. v. 1. Bacterioses and Mycoses. 3 ed. Washington D. C.: Pan American Health Organization, 2003, 384 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Departamento Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)** [on line]. Disponível:< <http://www.agricultura.gov.br>> [capturado em 12 fev. 2009].

BROWN, W.H. e de ANDA, J.H. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 212, p. 557-559, 1998.

CARSON, F.L., HLADIK, C. **Histotechnology: A Self-Instructional Text**. 3.ed. American Society for Clinical Pathology (ed). 2008.

CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; EVANS, R. T.; FORSTER, F.; NEILL, S. D. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. **Journal of Comparative Pathology**. v. 121, n. 4, p. 321-337, 1999.

CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 53-63, 1994.

FRÁGUAS, S. A.; CUNHA-ABREU, M. S.; FERREIRA, A. M. R.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W.; FONSECA, L. S.; FERREIRA, R.; LILENBAUM, W. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 15, n. 3, p. 117-121, 2008.

HUARD, R. C.; FABRE, M.; HAAS, P.; LAZZARINI, L. C. O.; SOOLINGEN, D.; COUSINS, D.; HO, J. L. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n.12, p.4271-4287, 2006.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.3, p.319-323, 2003.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.111-124, 1994.

MURAKAMI, P. Identificação Molecular de Bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em Quatis (*Nasua nasua*) e Antas (*Tapirus terrestris*). Curitiba, 2007. 102 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)**, Setor de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

NEILL, S. D.; CASSIDY, J.; HANNA, J.; MACKIE, D. P.; POLLOCK, J. M.; CLEMENTS, A.; WALTON, E.; BRYSON, D. G. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle using assay for bovine interferon-gamma. **The Veterinary Record**, v. 135, p. 134-135, 1994.

O'REILLY, L.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Diseases**, v. 76, sup. 1, p.1-46, 1995.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. e HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**, 9ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1737p, 2002.

REIS, D.O.; COLEHO, H.E.; LUCIO, N.F. Características morfológicas das lesões de tuberculose, em bovinos abatidos. **Higiene Alimentar**, v. 10. n. 41. p. 15-16, 1996.

ROMERO, R.E.; GARZÓN, D.L.; MEJÍA, G.A.; MONROY, W.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.63, p.101-106, 1999.

SALAZAR, F. H. P. Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil. Mato Grosso do Sul, 2005. 73 p. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2005.

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA, E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 20, p. 164-169, 2008.

WHIPPLE, D.L., BOLIN, C.A. & MILLER, J.M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 8, p. 351-354, 1996.

3. Comparative diagnostic methods and rpoB gene evaluation of a dairy herd infected with *Mycobacterium bovis*

Author's list

Corresponding author: Alexander Welker Biondo

Name of the Institution: Universidade Federal do Paraná, Brazil

Place where the work was carried out: Curitiba, Paraná State, Brazil

Title: Comparative diagnostic methods and rpoB gene evaluation of a dairy herd infected with *Mycobacterium bovis*.

Authors:

Cavazzani, Luiz Felipe M.; Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80035, Brazil.

Biondo, Alexander Welker; dual affiliation. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80035, Brazil and Dept. of Vet. Pathobiology University of Illinois, Urbana, IL 61802, USA.

Sousa, Renato Silva de: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80035, Brazil.

Monego, Fernanda: Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80035, Brazil.

Teixeira, Maria Ângela: Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná, 80040, Brazil.

Biesdorf, Sônia Maria: Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná, 80040, Brazil.

Carvalho, Regina Célia Zonta de: Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná, 80040, Brazil.

Nakatani, Sueli Massumi: Laboratório Central do Estado do Paraná, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, 80060, Brazil.

Barros, Ivan de R. ; Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80035, Brazil

Corresponding author: Dr. Alexander W. Biondo. Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Campus Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, Curitiba, Paraná State, 80035, Brazil. +55 41 3350-5723. E-mail address: abiondo@illinois.edu

Summary

Tuberculosis is an infectious disease of global scope that affects humans and several other animal species. The main species infecting cattle is *Mycobacterium bovis*, which is endemic in Brazil and causes economic losses by reducing the productivity of livestock and loss of carcasses at slaughterhouses. Moreover as zoonosis, *M. bovis* may infect humans, causing a disease clinically and pathologically indistinguishable from infection by *M. tuberculosis*. *M. bovis* is transmitted mainly through aerogenes among cattle and the consumption of raw milk and dairy products for people. The intradermal test is the standard method for diagnosis, but has low sensitivity and specificity. This study aimed to compare the diagnosis of bovine tuberculosis by the intradermal test, Fite-Faraco stain (modified Ziehl-Nielsen) and characterize *rpoB* gene from 35 herd reagents and negative or indeterminate for skin test.

Impacts

1. Bovine tuberculosis still remains an important zoonosis in developing countries, and a re-emerging infectious disease of worldwide occurrence.
2. Although well known techniques such as histopathology, histochemistry and culture are still the golden standard methods for *ex vivo* diagnosis, their low sensitivity and specificity has limited reliable diagnosis, therapy, control, epidemiology and eradication. New methods should be tested and improved.
3. *Mycobacterium bovis* genotyping is very important due to *rpoB* gene prevalence which may be used to obtain the classification of mycobacteria infecting herds.

Keywords

Cattle, *Mycobacterium bovis*, *rpoB* gene, zoonosis, tuberculin skin test

Introduction

In developing countries, Bovine tuberculosis still remains an important zoonosis that spreads to humans beings through the inhalation of droplet nuclei or by ingestion of infected meat or raw dairy products (LEITE et al., 2003; THOEN et al., 2006).

Bovine tuberculosis is a chronic granulomatous disease mainly affecting lymph node and lung tissues of cattle. It is caused by *Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex group of bacteria. At the genome level, *M. bovis* shares 99.95% identity with *Mycobacterium tuberculosis*, the agent of human tuberculosis (GARNIER, 2003).

M. bovis lymphadenitis in cattle presents as single or multiple lesion foci, which in advanced cases can expand to occupy the entire tissue space of the affected lymph node. The lesions vary in character, from necrotic with a predominantly neutrophilic cellular infiltration and no distinct lesion margination, through clearly marginated caseous or caseocalcified lesions, to lesions with distinctive granuloma-type margination and primary mineralisation; only rarely are there heavily fibrotic, encapsulated lesions of the classical tubercle nature in cattle lymphadenitis (GRIFFIN, et al. 2006).

The cornerstone of tuberculosis control in cattle and other species is the accurate detection and removal of animals infected with *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Post mortem examination of cattle and bacteriological examination of lesions are critical steps in the diagnosis of bovine tuberculosis. A tentative diagnosis of bovine tuberculosis can be made following the finding of typical lesions during necropsy. These lesions should be collected for laboratory confirmation of *Mycobacterium bovis* infection. A presumptive diagnosis can be made using histopathology but a definitive diagnosis is dependent on the isolation of *M. bovis* (CORNER, 1994).

In Brazil the diagnosis of tuberculosis in cattle is given by the intradermal test as a test field, indicated by the immune response mediated by cells. Has played a crucial role in eradication programs, as the first diagnostic test (BRASIL, 2006). Despite being safe, the tuberculin test has some limitations. Nonspecific reactions may occur by prior contact with other environmental mycobacteria resulting in false positive. No reactivity leading to false negatives resulting from recent infections, poor general health, immunosuppression postpartum among others (MONAGHAN et al., 1994, NEILL et al., 1994) and also cross-reactions with other pathogens not listed as *Corynebacterium spp.* and *Nocardia spp.* (ROMERO et al., 1999). The confirmation of the results of skin test can be done by detection of typical lesions at *post-mortem*. Histopathologic analysis can increase diagnostic confidence. Careful examination of six pairs of lymph nodes of the lungs, head and mesentery can establish the diagnosis in 95% of cattle with gross lesions. In the case of recent infections will be no visible gross lesions typical (CORNER, 1994). The Lymph nodes of mandible, the parotid, the mediastinum, the tracheobronchial and mesenteric are recommended to utilize for detect *post mortem* typical lesions (BROWN and ANDA, 1998). Whipple et al. (1996) in a study of 30 positive for bovine tuberculosis found major changes in the tracheobronchial lymph nodes, mediastinal and retropharyngeal.

In this work, were analyzed 107 samples, sections of lung, lymph nodes of the head (sublingual, carotid and retropharyngeal) and the thoracic lymph nodes (mesenteric, bronchial, mediastinal or hepatic), from 35 bovines reagents, negative or indeterminate for the tuberculin test (skin test). These animals were from a region with great handling livestock (Central-Eastern region) in the state of Paraná, Brazil. The samples were analyzed by classical diagnostic methods for detection of bovine tuberculosis, histopathological examination, culture and *rpoB* genotyping.

Material and Methods

Tuberculin Skin Test

For Single Intradermal Tuberculin Test (SITT), Tuberculin test was applied 0.1 ml of protein derived purified of *Mycobacterium bovis* (PPD bovine) in the caudal fold internal. The read-out was performed at 72 h post-inoculation and was recorded as positive when the induration presented a difference higher than 3 mm between both measures. All the animals were submitted to two tuberculin tests with

an interval of 2 months between both measures. The tuberculin test was performed by a veterinarian licensed to perform health examinations in accordance with the PNCEBT (BRAZIL, 2006).

Biological samples

In a routine analysis were found 35 cows suspected of tuberculosis in the central eastern region of the state of Paraná, Brazil. These animals were submitted to the tuberculin skin test where can be identified with positive, negative and inconclusive results. According to the standards of the National Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) animals showing positive results and inconclusive should be directed to stamping as well as animals that had close to these results (BRAZIL, 2006). So these 35 cattle were sent to this process of stamping in accordance with the rules of PNCEBT.

A hundred and seven samples were collected from these thirty-five bovines. The samples were selected during *post mortem* inspection in an abattoir in the metropolitan region of Curitiba, capital of the state of Paraná, Brazil. The samples used were sections of lung, lymph nodes of the head (sublingual, carotid and retropharyngeal) and lymph nodes of the thoracic cavity mesenteric, bronchial, mediastinal, or liver). At the time of collection was made a gross examination for the location of tuberculous-like lesions, given preference for the collection of samples with lesions. The samples were placed in containers with ice for transport, and then were divided into three aliquots. Aliquot 1 was used for culture. Aliquot 2 were used for DNA extraction control and direct amplification by PCR. Aliquot 3 were used for stained with hematoxylin-eosin and Ziehl–Neelsen modified Fite-Faraco stain.

Ziehl–Neelsen modified Fite-Faraco staining

Aliquot 3 were sectioned so that each fragment of injury contains all layers of the tuberculous-like lesions, namely the transition between the lesion and the tissue apparently normal, the capsule and necrotic tissue. After this process, each section was wrapped in sterile plastic wide mouth, containing buffered formalin 10% in an amount in which all the material was soaked in the solution. Once set, the samples were processed by routine technical inclusion in paraffin and cut at 4 micrometers, resulting in two histological slides of each block. The slides were fixed and stained with hematoxylin-eosin in order to visualize pathological changes color and Ziehl–Neelsen

modified Fite-Faraco stain, in order to visualize acid-fast bacilli resistant (Carson & Hladik, 2008).

Culture for *M. bovis*

Aliquot 1 of all the 107 samples were decontaminated by Petroff's Sodium Hydroxide method (Kent and Kubica, 1985) and were used for smear preparation and culture in Stonebrink (Stonebrink et al., 1969) and in Lowenstein-Jensen media (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA). Cultures were incubated at 37° C for up to 2 months, respectively, in Stonebrink and Lowenstein-Jensen media. Acid-fast bacilli (AFB) positive colonies were confirmed to be *M. bovis* by morphology and biochemical methods (Kent and Kubica, 1985) All positive cultures had their DNA extracted.

DNA extraction and preparation

Mycobacterial DNA was extracted from all of the 35 carotid lymph node samples (aliquot 2) and positive Stonebrink or Lowenstein-Jensen culture. Briefly, samples were decontaminated by Petroff's Sodium Hydroxide method (Kent and Kubica, 1985) and the pellet was boiled for 5 min. Tris-EDTA buffer (10 mm Tris-HCl, 10 mm EDTA pH 8.0) (500 µl) was added to the pellet and then homogenized by vortex for 10 s. They were then boiled for 5 min and stored overnight at - 20° C. DNA were further extracted by two volumes of phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, v/v) followed by two steps of extractions with chloroform–isoamyl alcohol (24 : 1, v/v). DNA was purified by ethanol precipitation and further dissolved with Tris-EDTA RNase buffer. All extracted DNA were stored at - 20° C until use.

Genotyping assays

For all assays, PCR reactions were prepared with final volume of 50 µl, containing 5 µl (1 / 10 of total volume) of buffer 10X Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM of each deoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 20 pmol of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 5 µl of extracted DNA. 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for each reaction. The final volume was obtained by adding ultrapure water. The PCR for the identification was carried out according Adekambi et al. (2003). Primers MycoF (5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3' from 2573 base to base 2592) and MycoR (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3' from 3316 base to base 3337) located in two conserved regions flanking the more variable region of *rpoβ* gene were used in all

reactions. In order to amplify a region of 764 base pairs in clinical isolates. All reactions were accompanied by a control reaction or white (5 µl ultrapure water) and a positive control (5 µl DNA or 50,0 ng/µl of *M. bovis* strain ATCC 19210). The amplification consisted of 35 cycles with a denaturation at 94 ° C for 30 seconds, primer annealing at 64 ° C for 30 seconds and DNA extension at 72 ° C for 90 seconds. The amplification process started an initial denaturation of 95 ° C for 1 minute and ends with a final extension at 72 ° C for 5 minutes. The pattern of amplification products of all reactions was obtained by electrophoresis on agarose gel 1.5%, containing ethidium bromide (0.5 µg/mL), visualized with UV transillumination and photographed with a photo documentation system. For the sequencing samples were sent to Macrogen Inc. (Shipping Address: Macrogen Inc. - 908 World Meridian Center. 60-24 Gasan-dong, Geumchun-gu Seoul, Korea 153-023) and sequenced by the method of Single Extension, using fluorescent Specific Big Dye Terminator cycle sequencing kit v. 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's instructions. The products were detected using the system 3730xl Automatic Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The sequences obtained were compared with those deposited in GenBank using the BLAST (basic local alignment tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and aligned with selected sequences from ATCC strains with the program BioEdit version 7.0.9 (Tom Hall Ibis Biosciences a subsidiary of Isis Pharmaceuticals 1891 Rutherford Road Carlsbad, CA 92008).

Results and Discussion

In the skin test analyses of the 35 bovines, 48,57% (17/35) were positive, 28,57% (10/35) were negative and 22,85 (8/35) were inconclusive. The presence of inconclusive results demonstrate the limitation of use of the tuberculin test. This result may have occurred for several reasons, among which, no reactivity due to recent infections and cross-reactivity with other pathogens with a low reactivity (MONAGHAN et al. 1994).

Macroscopic examination showed lesion in 85,71 % (30/35) of animals, a total of 79,43% (85/107) samples . These results are described in Table 1 along with the result of hematoxylin and eosin stain and Ziehl–Neelsen modified Fite-Faraco stain.

Table 1. Results of Macroscopic , hematoxylin and eosin stain and Ziehl–Neelsen modified Fite-Faraco stain

Sample	MACRO		
Cow	<i>post mortem</i>	hematoxylin and eosin stain	Fite Faraco
1	B, D, F	D	D
2	A	A	A, F
3	A*, B, D* e F*	C, E	C, E
4	A* e D	A, C1, E	A, E
5	C1*, C2*, D	E	-
6	C1, C2, D	s/ lesão	-
7	A e D	A, C	C
8	Without lesion	Without lesion	-
9	C e F	C	C
10	A	A	-
11	A	Without lesion	-
12	C*, E, F	Without lesion	-
13	A, C*, D*, E*, F*	Without lesion	-
14	A*, C*, D, F*	Without lesion	-
15	A*, D*	Without lesion	-
16	A, C, D, E*, F*	A, C, E	A, C, E
17	A*, C*, D, E*	E	E
18	A*, B*, C*, F*	A	-
19	A*, C*, D*, F*	Without lesion	-
20	A, C*, D, E	F	-
21	A, D, E	C	-
22	A, B, C, D	A, C, E	A, C, E
23	A, B, C, D	B, E	B, E
24	A, C, D, F	Without lesion	-
25	Without lesion	Without lesion	-
26	A, D, E	Without lesion	-
27	D	E	E
28	D e E	D	D
29	Without lesion	Without lesion	-

30	D, E	C, E	-
31	A	A	A
32	Without lesion	Without lesion	-
33	Without lesion	Without lesion	-
34	A e E	A, A1, A2	A, A1, A2
35	D, E	E	-

A = Lung and / or bronchial or mediastinal lymph node, B = liver and / or hepatic lymph node, C = mesenteric lymph nodes, D = retropharyngeal lymph node, E = carotid lymph node, F = sublingual lymph node, 1-2 = samples from different regions of the same material, * Only macroscopic tissue changes, no macroscopic lesions compatible with tuberculosis. - = negative

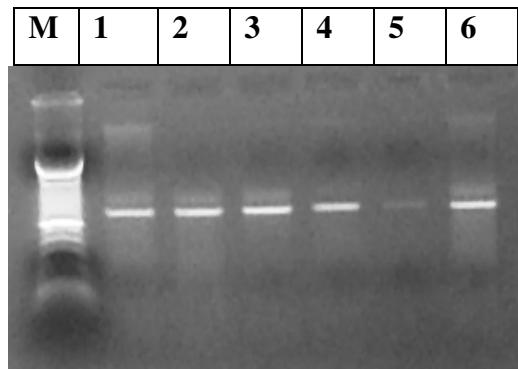
85.71% (30/35) showed gross lesions suggestive of tuberculosis. In hematoxylin-eosin stain, 60.00% (21/35) had lesions suggestive of tuberculosis. Staining with Fite-Faraco, 40.00% (14/35) of animals had lesions suggestive of tuberculosis, resulted positive for acid-fast bacilli (AFB). In relation to the skin test 48.57% (17/35) of animals were diagnosed positive for TB, 22.86% (8 / 35) had inconclusive results and 28,57% (10/35) tested negative. With the filing of these data we obtain from the 17 animals positive for the tuberculin test, 58.82% (10/17) animals showed lesions characteristic of tuberculosis in the presence of AFB, 88.23% (15/17) had macroscopic lesions suggestive tuberculosis and 52.94% (9 / 17) had some type of microscopic damage. In the skin test inconclusive animals (8 animals), 50% (4 / 8) were positive for the presence of AFB and 87,50% (7/8) showed lesions suggestive of tuberculosis as same as figure 1 . According to Reis et al. (1996) gross diagnoses of lymphadenitis data in the inspection line when confronted with the microscopic represent 37.93% of diagnostic errors. These data reinforces a complementary test to the tuberculin test.

Figure 1: Sample of lung (animal in 22) that had inconclusive results for tuberculin reaction but with lesions suggestive of tuberculosis.



All the samples were negative for the amplification of the *rpoB* prior the bacteriological culture. Only 4 samples grown in culture medium, where 3 (Samples 1, 2 and 5) grew in Stonebrink medium (Stonebrink et al., 1969) and 1 sample (Sample 35) grew in Lowenstein-Jensen medium (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA). These samples had their DNA extracted and made PCR resulting Figure 2 showing the amplification of a fragment of 764 base pairs.

Figure 2. Electrophoretic separation of amplified DNA in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane M, 100 bp ladder DNA molecular size markers; lane 1, sample 1; lane 2, sample 2; lane 3, sample 5; lane 4, sample 35; lane 5, negative control without DNA and Lane 6 *M. bovis* strain ATCC 19210.



The sequencing of sample 1 showed a fragment with 746 nucleotides, the sample 2 728 nucleotides, the sample 5 743 nucleotides and the sample 35 showed a fragment of 742 nucleotides. When we perform the analysis by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) to get all the samples the same result, that presented in Table 3.

Table 3. Analysis by BLAST showed a maximum identity with various species of mycobacteria

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP001658.1	Mycobacterium tuberculosis KZN 1435, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
AP010918.1	Mycobacterium bovis BCG str. Tokyo 172 DNA, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
CP000717.1	Mycobacterium tuberculosis F11, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
CP000611.1	Mycobacterium tuberculosis H37Ra, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
AM408590.1	Mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P2, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
AE000516.2	Mycobacterium tuberculosis CDC1551, complete genome	1304	1304	97%	0.0	99%	
BX842574.1	Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 3/13	1304	1304	97%	0.0	99%	
BX248336.1	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complete genome; segment 3/14	1304	1304	97%	0.0	99%	
U12205.1	Mycobacterium tuberculosis H37Rv RNA-polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1304	1304	97%	0.0	99%	

When these samples are analyzed together with the program BioEdit (Alignmet Sequence Editor) we obtain a maximum identity among themselves and the positive control (*M. bovis* strain ATCC 19210). This demonstrates that the sequence of the *rpoB* gene from these *M. bovis* is highly conserved showing no mutation that would render the treatment of this herd by rifampicin.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Araucária, Paraná , Brazil.

References

Leite, C.Q.F., I.S. Anno, S.R.A. Leite, E. Roxo, G.P. Morlock, and R.C. Cooksey. Isolation and identification of Mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98, 319–323, 2003.

Thoen, C., P. LoBue, and I. de Kantor. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*, 112, 339–345, 2006.

Corner, L. A. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40: 53-63, 1994.

Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Camus, J. C.; Medina, N.; Mansoor, H.; Pryor, M.; Duthoy, S.; Grondin, S.; Lacroix, C.; Monsempe, C.; Simon, S.; Harris, B.; Atkin, R.; Doggett, J.; Mayes, R.; Keating, L.; Wheeler, P. R.; Parkhill, J.; Barrell, B. G.; Cole, S. T.; Gordon, S. V.; Hewinson, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100:7877-7882, 2003.

Griffin, J.F.T.; Rodgers, C.R.; Liggett, S.; Mackintosh, C.G. Tuberculosis in ruminants: Characteristics of intra-tonsillar *Mycobacterium bovis* infection models in cattle and deer. *Tuberculosis*, 86, 404–418, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Departamento Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) [on line]. Available from <<http://www.agricultura.gov.br>>.

Monaghan, M.L.; Doherty, M.L.; Collins, J.D.; Kazda, J.F.; Quinn, P.J. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, 40,111-124, 1994.

Neill, S. D.; Cassidy, J.; Hanna, J.; Mackie, D. P.; Pollock, J. M.; Clements, A.; Walton, E.; Bryson, D. G. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle using assay for bovine interferon-gamma. *The Veterinary Record*, 135, 134-135, 1994.

Romero, R.E.; Garzón, D.L.; Mejía, G.A.; Monroy, W.; Patarroyo, M.E.; Murillo, L.A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 63, 101-106, 1999.

BROWN, W.H. e de ANDA, J.H. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. Journal of the American Veterinary Medical Association. v. 212, p. 557-559, 1998.

WHIPPLE, D.L., BOLIN, C.A. & MILLER, J.M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. v. 8, p. 351-354, 1996.

CARSON, F.L., HLADIK, C. Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3.ed. American Society for Clinical Pathology (ed). 2008.

Kent, P.T., and G.P. Kubica. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). U.S Department of Health and Human Services, Atlanta. 1985

Stonebrink, B., J. Duoma, A. Manten, and R.J. Mulder. A comparative investigation on the quality of various culture media as used in the Netherlands for the isolation of Mycobacteria. Select Pap (The Hague) 12, 5–47, 1969.

Adékambi, T.; Colson, P.; Drancourt, M. *rpoB*-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology. 41(12), 5699-5708, 2003.

Reis, D.O.; Coelho, H.E.; Lucio, N.F. Características morfológicas das lesões de tuberculose, em bovinos abatidos. Higiene Alimentar, 10(41), 15-16, 1996.